



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

AUTOREFERAT

Dr Anna Haduch

**Zakład Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk**

Kraków 2022

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	4
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4.2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. b wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.....	5
4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego.....	6
4.3.1. Wprowadzenie.....	6
4.3.2. Ocena znaczenia mózgowego cytochromu P450 2D (CYP2D) w syntezie serotoniny (5-HT) na drodze regeneracji z 5-metoksytryptaminy (5-MT, metabolitu melatoniny).....	11
4.3.3. Badania wpływu leków przeciwdepresyjnych na aktywności enzymu CYP2D w mózgu i wątrobie w warunkach chronicznego łagodnego stresu w zwierzęcym modelu depresji u szczura.....	19
4.3.4. Badania wpływu starzenia się oraz deficytu serotoniny w mózgu na aktywność CYP2D w mózgu i wątrobie samców i samic szczura.....	21
4.3.5. Podsumowanie.....	30
4.3.6. Wykaz skrótów.....	32
4.3.7. Piśmiennictwo.....	33

5. Informacja o wykazaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.....	37
5.1. Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora.....	37
5.2. Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora.....	42
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.....	53
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.....	54

1. Imię i nazwisko.

Anna Haduch

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

- **2004** Stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Praca doktorska pt.: „Wpływ leków psychotropowych na aktywność izoenzymów rodziny drugiej i trzeciej cytochromu P-450” wykonana w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie (Promotor: prof. dr hab. Władysława Anna Daniel).
- **1995** Stopień magistra biologii. Praca magisterska pt.: „Behawioralna reakcja samic na różne dawki chemosygnali zawartych w moczu samców nornicy rudej (*Clethrionomys glareolus*)” wykonana w Pracowni Biologii Rozrodu Ssaków Zakładu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie; Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, kierunek biologia. (Promotor: prof. dr hab. Anna Marchlewska Koj).
- **1994** Zaświadczenie uzyskania kwalifikacji pedagogicznych do pracy nauczycielskiej wydane przez Studium Pedagogiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- **2012** obecnie Adiunkt w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie
- **2005-2011** – Asystent w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie
- **1995-2004** – Pracownik inżyniersko-techniczny w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Udział cytochromu P450 (CYP) w metabolizmie substratów istotnych dla prawidłowego funkcjonowania mózgu. Znaczenie fizjologiczne i farmakologiczne.

4.2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. b wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl sześciu oryginalnych artykułów naukowych oraz jedna praca przeglądowa podsumowująca temat, opublikowanych w latach 2013-2022 w anglojęzycznych, recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o sumarycznym współczynniku oddziaływania impact factor (IF) równym **29.429** oraz punktacji wg Ministerstwa i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) równej **385**.

Prace wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Haduch A**, Bromek E, Sadakierska-Chudy A, Wójcikowski J, Daniel WA. The catalytic competence of cytochrome P450 in the synthesis of serotonin from 5-methoxytryptamine in the brain: an in vitro study. **Pharmacol Res.** **2013** Jan;67(1):53-9. doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.009. Epub 2012 Oct 23. PubMed PMID: 23098818.

(IF₂₀₁₃ = 3.976; punkty MNiSW = 40; liczba cytowań bez autocytowań: 19; z dn. 28.06.2022)

2. **Haduch A**, Bromek E, Kot M, Kamińska K, Gołombiowska K, Daniel WA. The cytochrome P450 2D-mediated formation of serotonin from 5-methoxytryptamine in the brain in vivo: a microdialysis study. **J Neurochem.** **2015** Apr;133(1):83-92. doi: 10.1111/jnc.13031. Epub 2015 Feb 8. PubMed PMID: 25581337.

(IF₂₀₁₅ = 3.842; punkty MNiSW = 30; liczba cytowani bez autocytowań: 13; z dn. 28.06.2022)

3. **Haduch A**, Bromek E, Wójcikowski J, Gołombiowska K, Daniel WA. Melatonin Supports CYP2D-Mediated Serotonin Synthesis in the Brain. **Drug Metab Dispos.** **2016** Mar;44(3):445-52. doi: 10.1124/dmd.115.067413. PubMed PMID: 26884482.

(IF₂₀₁₆ = 4.242; punkty MNiSW = 30; liczba cytowani bez autocytowań: 16; z dn. 28.06.2022)

4. **Haduch A**, Rysz M, Papp M, Daniel WA. The activity of brain and liver cytochrome P450 2D (CYP2D) is differently affected by antidepressants in the chronic mild stress (CMS) model of depression in the rat. **Biochem Pharmacol.** **2018** Oct;156:398-405. doi: 10.1016/j.bcp.2018.09.005. Epub 2018 Sep 7. PubMed PMID: 30195732.

(IF₂₀₁₈ = 4.825; punkty MNiSW = 40; liczba cytowani bez autocytowań: 5; z dn. 28.06.2022)

5. **Haduch A**, Pukło R, Alenina N, Nikiforuk A, Popik P, Bader M, Daniel WA. The effect of ageing and cerebral serotonin deficit on the activity of cytochrome P450 2D (CYP2D) in the brain and liver of male rats. **Neurochem Int.** **2020** 141:104884. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104884>

(IF₂₀₂₀ = 3.921; punkty MNiSW = 100; liczba cytowani bez autocytowań: 3; z dn. 28.06.2022)

6. **Haduch A**, Danek P, Kuban W, Pukło R, Alenina N, Gołębiowska J, Popik P, Bader M, Daniel WA. Cytochrome P450 2D (CYP2D) enzyme dysfunction associated with aging and serotonin deficiency in the brain and liver of female Dark Agouti rats. **Neurochem Int.** **2022** Jan;152:105223. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105223. Epub 2021 Nov 13. PMID: 34780807

(*IF*₂₀₂₂ = 3.921; punkty *MNiSW* = 100; liczba cytowań bez autocytowań: 0; z dn. 28.06.2022)

7. **Haduch A**, Daniel WA. The engagement of brain cytochrome P450 in the metabolism of endogenous neuroactive substrates: a possible role in mental disorders. **Drug Metab Rev.** **2018** Nov;50(4):415-429. doi: 10.1080/03602532.2018.1554674. Epub 2019 Jan 7. Review. PubMed PMID: 30501426. (*praca poglądowa*)

(*IF*₂₀₁₈ = 4.702; punkty *MNiSW* = 45; liczba cytowani bez autocytowań: 9; z dn. 28.06.2022)

4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.3.1. Wprowadzenie

Dotychczasowe badania mózgowych enzymów cytochromu P450 (CYP) sugerują, iż są one zaangażowane w metabolizm wielu endogennych substancji o dużym znaczeniu biologicznym dla funkcji mózgu, takich jak neurosteroidy (testosteron, androstenedion, DHEA i progesteron), neuroprzekaźniki monoaminergiczne dopamina i serotonina, kwas arachidonowy, jak również substratów egzogennych, w tym leków psychotropowych (Miksys and Tyndale 2013). Generalnie, poziom ekspresji enzymów CYP w mózgu jest około sto razy niższy niż w wątrobie będącej centrum metabolicznym organizmu, w którym znajduje się główna pula enzymów cytochromalnych. Istnieją wyjątki od tej reguły, takie jak np. enzymy CYP2D4 i CYP2B, które w komórkach mózgowych mogą osiągać wyższe stężenia niż w hepatocytach. Ponadto niektóre enzymy cytochromu P450 takie jak CYP2D18 wykazują ekspresję specyficzną wyłącznie dla tkanki mózgowej (Kawashima et al. 1996; Miksys et al. 2000a; 2000b). Enzymy CYP są zlokalizowane głównie w neuronach, ale stwierdza się ich obecność również w komórkach glejowych mózgu. Stosunkowo wysokie stężenie CYP występuje w ścianach naczyń krwionośnych tzw. bariery krew-mózg oraz w narządach okołokomorowych (splot naczyniówkowy, tylna przysadka) pozbawionych tej bariery anatomicznej, gdzie pełnią rolę tzw. bariery biochemicznej, uczestnicząc w naturalnej ochronie mózgu przed szkodliwymi substancjami z zewnątrz. Enzymy CYP w mózgu zlokalizowane są nie tylko w siateczce śródplazmatycznej (jak ma to miejsce w wątrobie), ale także w błonach mitochondrialnych i jądrowych i są niejednorodnie rozmieszczone w

poszczególnych rejonach mózgu. Takie rozmieszczenie pozwala przypuszczać, że mogą one pełnić różne funkcje w poszczególnych rejonach mózgu. Przykładowo, w testach behawioralnych przeprowadzonych na szczurach, u osobników najlepiej uczących się, odnotowano zwiększoną ekspresję CYP2D w hipokampie, strukturze mózgu zaangażowanej w procesy uczenia się i pamięci (Gjota-Ergin et al. 2018). Obserwacja ta sugeruje, że zróżnicowana ekspresja enzymu CYP2D w hipokampie może mieć udział w indywidualnych zdolnościach do uczenia się u poszczególnych osobników i jest wyższa u zwierząt z lepiej funkcjonującymi procesami poznawczymi. Enzymy cytochromu P450 mogą tworzyć lokalnie w mózgu „mikrośrodowiska” dla endogennych substratów, psychoaktywnych leków i ich metabolitów. Na podstawie monitorowania stężenia leków we krwi obwodowej, trudno przewidzieć stężenia, jakie osiągają one w miejscu swojego docelowego działania w poszczególnych rejonach mózgu. Z tego powodu, między innymi, istotne jest poznanie, w jaki sposób funkcjonują mózgowy enzymy CYP (Miksys and Tyndale 2004).

Spośród cytochromów P450 występujących w mózgu najwyższy poziom ekspresji wykazuje podrodzina CYP2D. Enzymy wątrobowe tej podrodziny są odpowiedzialne za metabolizm wielu różnych leków, m.in. leków przeciwdepresyjnych, neuroleptyków, leków przeciwwarymicznych, przeciw nadciśnieniu, ponadto morfiny, amfetaminy, kancerogenów i neurotoksyn, np. 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP). U człowieka podrodzina CYP2D jest reprezentowana przez enzym CYP2D6 podczas, gdy u szczura składa się ona z 6 enzymów CYP2D1-5 i CYP2D18 (Funae et al. 2003). Szczur jest zwierzęciem laboratoryjnym wykorzystywanym często do badania mózgowego CYP2D z powodu wysokiego podobieństwa budowy (71-77% zgodności sekwencji aminokwasów) oraz zbliżonych właściwości katalitycznych tych enzymów u obu gatunków. Ludzki CYP2D6 wykazuje wysoki stopień polimorfizmu genetycznego, który prowadzi do powstania czterech podstawowych fenotypów różniących się stopniem aktywności enzymu. Stąd w populacji ludzkiej wyróżnia się osobniki słabo-, średnio-, szybko- i ultraszybko metabolizujące substraty CYP2D6 (Gaedigk et al. 2017). Mózgowy cytochrom CYP2D wykazuje specyficzną wrażliwość na indukcję przez ksenobiotyki, które nie wpływają na ten enzym w wątrobie. Należą do nich nikotyna i alkohol oraz niektóre leki psychotropowe takie jak kłozapina i nefazodon (Miksys et al. 2002; Yue et al. 2008; Haduch et al. 2011). Metabolizm leków katalizowany przez CYP2D w mózgu nie odgrywa większej roli w ich eliminacji z organizmu, ale ma duże znaczenie lokalne, gdyż może modyfikować działanie leków wywierających swoje efekty w mózgu. Przykładowo, eksperymentalnie wykazano, że

mózgowy CYP2D6 decyduje w znacznym stopniu o działaniu przeciwbólowym kodeiny, gdyż katalizuje bioaktywację tego proleku do aktywnego metabolitu morfiny o wielokrotnie silniejszym działaniu anelgetycznym (McMillan and Tyndale 2015). W przeciwieństwie do wątrobowego CYP2D, którego główne funkcje w metabolizmie leków zostały stosunkowo dobrze zbadane, rola CYP2D w metabolizmie lokalnym mózgu nadal jest niewystarczająco poznana. Badania *in vitro* sugerują, że mózgowy CYP2D odgrywa ważną rolę w katalizowaniu reakcji z udziałem endogennych substratów o dużym znaczeniu dla funkcji mózgu, takich jak neuroprzekaźniki, neurosteroidy, cholesterol i kwas arachidonowy (Toselli et al. 2016; Navarro-Mabarak et al. 2018). Hiroi i współpracownicy (1998) stwierdzili w badaniach *in vitro* z użyciem rekombinowanego enzymu oraz mikrosomów wątrobowych, że ludzki CYP2D6 katalizuje aromatyczną hydroksylację tyraminy (amina biogenna) do dopaminy, tworząc w ten sposób dodatkową ścieżkę jej biosyntezy. W naszym laboratorium wykazaliśmy *in vitro* (mikrosomy mózgowe) oraz *in vivo* (metoda mikrodializy mózgu w modelu rezerpinowym), że CYP2D katalizuje tę reakcję także w mózgu szczura (Bromek et al. 2010; 2011). W badaniach *in vitro* pokazano również, że CYP2D6 jest zdolny do regeneracji serotoniny z 5-metoksytryptaminy (5-MT) (Yu et al. 2003), reakcji będącej brakującym ogniwem zamykającym cykl serotonina-melatonina, oraz dodatkową ścieżką biosyntezy serotoniny w mózgu, która powstaje głównie z tryptofanu. Nieznane jest fizjologiczne znaczenie tej reakcji, ale autorzy sugerują, że zróżnicowany poziom 5-MT w mózgu osób posiadających fenotyp szybko lub słabo metabolizujący w stosunku do CYP2D6, może być przyczyną różnic w osobowości i podatności na choroby. Zaobserwowano, że osobnicy słabo metabolizujący wykazują gorsze dostosowanie społeczne oraz są bardziej wybuchowi niż szybko metabolizujący. Z kolei szczurzy mózgowy enzym CYP2D18 może katalizować utlenienie dopaminy do toksycznego aminochromu, który prawdopodobnie jest zaangażowany w destrukcję neuronów dopaminergicznych (choroba Parkinsona) (Thompson et al. 2000). Zmiany poziomów mózgowych enzymów CYP, spowodowane ich indukcją lub supresją przez ksenobiotyki lub substancje endogenne, takie jak hormony sterydowe, mogą modulować lokalny poziom jego substratów, np. neurosteroidów i pośrednio wpływać na funkcje mózgu (takie jak pamięć, uczenie się, osobowość) lub na rozwój chorób neurologicznych. Istotne znaczenie dla roli, jaką odgrywają enzymy CYP w mózgu, ma ich lokalizacja w specyficznych rejonach, gdzie mogą one modyfikować farmakologiczne działanie leków na ośrodkowy układ nerwowy w strukturach docelowych. Wydaje się, iż międzypersonne różnice w odpowiedzi na leki działające w ośrodkowym układzie

nerwowym, które są niezależne od ich stężeń w osoczu, mogą odzwierciedlać między innymi indywidualne różnice w poziomie ekspresji CYP2D6 w mózgu. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań na wybranych lekach przeciwdepresyjnych i przeciwpsychotycznych sugerują, iż wpływ leków psychotropowych na mózgowy CYP2D jest odmienny niż w wątrobie i zależy od struktury mózgu. Zaobserwowane interakcje między lekami psychotropowymi a mózgowym CYP2D mogą mieć wpływ na metabolizm jego endogennych substratów (neurosteroidów, neuroprzebieżników monoaminergicznych) oraz na lokalną biotransformację leków (Haduch et al. 2011).

W cyklu prac, które zebrałam aby przedstawić moje osiągnięcie naukowe, zajęłam się kilkoma aspektami funkcjonowania enzymu CYP2D w mózgu. Po pierwsze starałam się udowodnić w eksperymentach *in vitro* oraz *in vivo* funkcjonowanie w żywym mózgu alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny katalizowanej przez CYP2D na drodze *O*-demetylacji 5-metoksytryptaminy do serotoniny, która może mieć znaczenie w suplementacji tego ważnego neuroprzebieżnika, szczególnie w warunkach niedoboru klasycznej drogi syntezy serotoniny z tryptofanu. Po drugie, starając się odkryć fizjologiczną i farmakologiczną rolę CYP2D w mózgu, podjęłam się zbadania, jak mózgowy enzym CYP2D zachowuje się w szczególnych warunkach eksperymentalnych, a mianowicie pod wpływem stresu w zwierzęcym modelu depresji CMS (Chronic Mild Stress), po zastosowaniu leków przeciwdepresyjnych escitalopramu i wenlafaksyny oraz pod wpływem starzenia i niedoboru serotoniny w mózgu zwierząt pozbawionych genu hydroksylazy tryptofanu 2 (TPH2-KO), podstawowego enzymu limitującego syntezę tego neuroprzebieżnika. Wpływ starzenia i niedoboru serotoniny na mózgowy CYP2D postanowiłam zbadać zarówno u samców jak i samic dla sprawdzenia różnic płciowych w funkcjonowaniu tego enzymu w mózgu.

Szlaki serotoninergetyczne w mózgu biorą początek z grup neuronów (B1 – B9) w jądrach szwu pnia mózgu, skąd wychodzą projekcje serotoninergetyczne prawie do wszystkich części centralnego systemu nerwowego. Z jąder szwu grzbietowego i środkowego neurony serotoninergetyczne docierają do struktur przodomózgowia. W tym obszarze, w specyficznych strukturach mózgu, serotonina uwalniana z zakończeń nerwowych spełnia wiele istotnych funkcji, m.in. jest mediatorem funkcji motorycznych (zwoje podstawy), bierze udział w kontroli łaknienia, rytmu dobowego, termoregulacji (podwzgórze), w regulacji snu (wzgórze), w procesach uczenia się, pamięci i stresu (hipokamp) oraz w kontroli nastroju i snu w korze mózgowej (Di Giovanni et al. 2008). Jak wiadomo, serotonina powstaje w mózgu z tryptofanu, egzogenego aminokwasu, pozyskiwanego przez organizm z pożywieniem, który

łatwo przenika przez barierę krew-mózg. Hydroksylacja i dekarboksylacja tryptofanu do serotoniny zachodzi w ciałach neuronów serotoninergicznym w pniu mózgu (w jądrach szwu). Neuroprzekaźnik jest magazynowany w pęcherzykach synaptycznych na zakończeniach nerwowych, a po uwolnieniu metabolizowany do kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA). Natomiast w szyszynce serotonina ulega acetylowacji i metylacji do melatoniny, hormonu spełniającego wiele ważnych funkcji w układzie nerwowym, m.in. odpowiedzialnego za utrzymanie rytmu dobowego. W metabolizmie melatoniny konkurują ze sobą różne ścieżki przemian biochemicznych. Zasadniczo jest ona utleniana przez enzymy cytochromu P450 do 6-hydroksymelatoniny. Jednak część melatoniny ulega deacetylowacji do 5-metoksytryptaminy (5-MT), z której na drodze *O*-demetylowacji regenerowana jest serotonina. Reakcja ta wydaje się mieć istotne znaczenie dla utrzymania prawidłowego poziomu indoloamin (serotoniny i 5-MT), szybko metabolizowanych przez monoaminooksydazę (MAO). A zatem *O*-demetylowacja 5-MT do serotoniny „oszczędza” egzogeny układ indolowy, umożliwiając jego odtwarzanie wewnątrz organizmu w zamkniętym cyklu przemian (melatonina → 5-metoksytryptamina → serotonina → N-acetyloserotonina → melatonina) (Yu et al. 2003). Reakcja *O*-demetylowacji 5-metoksytryptaminy do serotoniny może więc stanowić alternatywną ścieżkę (w stosunku do hydroksylacji tryptofanu) syntezy serotoniny w mózgu.

W badaniach z użyciem rekombinowanych enzymów CYP, mikrosomów wątrobowych oraz myszy transgenicznych z ludzkim CYP2D6 (Tg-2D6) Yu i wsp. (2003) wykazali, że ludzki enzym CYP2D6 jest zdolny do katalizowania ze znaczną specyficznością *O*-demetylowacji 5-metoksytryptaminy do serotoniny. Funkcjonowanie tej reakcji *in vivo* zostało zaobserwowane jedynie w tkankach obwodowych, na podstawie pomiaru stężenia serotoniny we krwi po dożylnym podaniu 5-metoksytryptaminy myszom transgenicznym (Tg-2D6) oraz myszom dzikiego typu. Wśród populacji rasy kaukaskiej (białej) 7-10% ludzi nie posiada funkcjonalnego białka CYP2D6 z powodu mutacji kodującego je genu i osobnicy ci mają upośledzony metabolizm substratów zależnych od CYP2D6. Niezależne badania kliniczne sugerują, że defekt genetyczny CYP2D6 (fenotyp „słabo metabolizujący”) koreluje ze specyficznymi cechami osobowości – skłonnością do lęku, impulsywnością i aspołecznością, wskazując na zaangażowanie CYP2D6 w metabolizm neuroaktywnych endogennych substratów o istotnej roli fizjologicznej w mózgu (Bertilsson et al. 1989; González et al. 2008). W modelu transgenicznych myszy z nadekspresją ludzkiego enzymu CYP2D6 (Tg-2D6) stwierdzono ogólnie wyższy poziom serotoniny w mózgu oraz mniejsze skłonności

lękowe w testach behawioralnych, w porównaniu z dzikim typem myszy (Cheng et al. 2013), lecz autorzy nie przedstawili dowodów na zaangażowanie alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny z 5-metoksytryptaminy w powyższych obserwacjach. Za istnieniem alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny z udziałem podrodziny CYP2D przemawia jednak fakt kolokalizacji substratu 5-metoksytryptaminy i enzymu CYP2D w określonych rejonach mózgu, np. w jądrach szwu pnia mózgu, w których znajdują się również ciała komórkowe neuronów serotonergicznym (Patel et al. 1986; Bromek et al. 2010).

Brak było jednak badań dających dowody na funkcjonowanie alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny na drodze *O*-demetylacji 5-MT z udziałem cytochromu P450 w mózgu. Dlatego zainteresowałam się tym tematem, istotnym z punktu widzenia fizjologii i farmakologii. Z powodu braku dostępnych technik umożliwiających śledzenie alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny bezpośrednio w mózgu człowieka, zajęłam się zbadaniem jej obecności w mózgu szczura. Wyniki tych badań mogły dać wyobrażenie o tym, co dzieje się w mózgu człowieka, z uwagi na znaczne podobieństwo między enzymami podrodziny 2D cytochromu P450 u obu gatunków, o czym wspomniano we wstępie. Ludzki enzym CYP2D6 łączy w swym działaniu kompetencje katalityczne większości szczurzych enzymów podrodziny CYP2D (CYP2D1-5, 2D18).

4.3.2. Ocena znaczenia mózgowego cytochromu P450 2D (CYP2D) w syntezie serotoniny (5-HT) na drodze regeneracji z 5-metoksytryptaminy (5-MT, metabolitu melatoniny).

W pierwszym etapie badań *in vitro* przyjąłam za cel: • zidentyfikowanie szczurzych enzymów cytochromu P450 zdolnych do katalizowania reakcji *O*-demetylacji 5-metoksytryptaminy do serotoniny, • porównanie aktywności szczurzego i ludzkiego cytochromu P450 w kierunku syntezy serotoniny (*in vitro*) oraz • zbadanie, czy alternatywna ścieżka syntezy serotoniny może funkcjonować w mózgu (*ex vivo*).

Badania *in vitro* zdolności katalizowania reakcji *O*-demetylacji 5-MT do serotoniny polegały na inkubacji egzogenego substratu z: • indywidualnie rekombinowanymi enzymami CYP (z ang. cDNA-expressed CYPs) (głównymi enzymami CYP u szczura: CYP1A1/2, 2A1/2, 2B1, 2C6/11/13, 2D1/2/4/18, 2E1, 3A2 oraz ludzkim CYP2D6), zakupionymi komercyjnie • frakcjami mikrosomalnymi z mózgu i wątroby szczurów przygotowanymi metodą różnicowego odwirowania • oraz zakupionymi ludzkimi mikrosomami wątrobowymi od osobników z allelem *CYP2D6*1* typu dzikiego lub od donorów ze zmutowanymi allelami *CYP2D6*4*4* (brak aktywnego białka enzymu) w medium inkubacyjnym zawierającym

Załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego NADPH. Pomiar ilości powstającego produktu został przeprowadzony z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną.

Wstępne badania *in vitro* dostarczyły pierwszych dowodów na poparcie hipotezy, że reakcja *O*-demetylacji 5-metoksytryptaminy do serotoniny zachodzi w mózgu, przy udziale enzymów podrodziny CYP2D.

Z kolei badania 'screeningowe' wykazały, że enzymy podrodziny CYP2D - CYP2D1/2 i CYP2D4/18 (główne mózgowe CYP2D) są najbardziej wydajne w katalizowaniu *O*-demetylacji 5-MT do serotoniny spośród głównych enzymów cytochromu P450 u szczura. Przeprowadzone w dalszej kolejności badania porównawcze kinetyki reakcji katalizowanej przez szczurze CYP2D1/2 i CYP2D4/18 i CYP2D6 pokazały, że szczurze enzymy CYP2D są wielokrotnie mniej efektywne w produkcji serotoniny niż ludzki CYP2D6. Synteza serotoniny z 5-MT zachodziła również w mikrosomach mózgowych przygotowanych z 9 testowanych struktur (jądro półleżące przegrody, podwzgórze, prążkowie, kora frontalna, kora, mózdzek, hippocamp, pień mózgu, reszta mózgu), a najwyższą wydajność reakcji *O*-demetylacji zaobserwowano w mózdzku. Powyższe wyniki pozytywnie korelują z dystrybucją białka CYP2D opisaną w literaturze i rozkładem aktywności CYP2D, którą zmierzaliśmy we wcześniejszych badaniach (Bromek et al., 2010) za pomocą szybkości specyficznie katalizowanej przez CYP2D reakcji 1'-hydroksylacji bufuralolu (Díaz-Mataix et al. 2005).

Do dalszych badań reakcji *O*-demetylacji 5-MT do serotoniny wybrałam pień mózgu – strukturę, w której kolokalizują enzym CYP2D i jego substrat 5-MT oraz zachodzi synteza serotoniny główną ścieżką z tryptofanu (w jądrach szwu). Pozytywne wyniki badań reakcji *O*-demetylacji 5-MT do serotoniny, przy udziale CYP2D w mikrosomach z pnia mózgu wskazują, że badana reakcja zachodzi w tkance mózgowej *in vitro*. W opisanych badaniach po raz pierwszy użyto tkanki mózgowej w celu zaobserwowania syntezy serotoniny alternatywną ścieżką. Ponadto udowodniono, że ścieżka ta jest katalizowana przez CYP2D, ponieważ była hamowana przez użyte w eksperymentach znane inhibitory CYP2D – chininę i fluoksetynę. Jak już wspomniałam, 7-10 % ludzi w populacjach białych ma defekt genu *CYP2D6*, który potencjalnie wpływa na reakcję syntezy serotoniny z 5-MT. Wpływ ten badałam inkubując substrat 5-MT z ludzkimi mikrosomami wątrobowymi pochodzącymi od donorów z dzikim allelem *CYP2D6*1* oraz od donorów ze zmutowanymi allelami *CYP2D6*4*4*, gdyż ludzkie mikrosomy mózgowe są niedostępne komercyjnie. Wyniki powyższych badań wskazują, iż defekt genetyczny CYP2D6 (ten sam enzym w mózgu i wątrobie człowieka) znacznie zmniejsza zdolność ludzkich mikrosomów do syntezy

Załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego serotoniny alternatywną ścieżką. Natomiast porównując zdolność mikrosomów wątrobowych ludzkich ze szczurzymi zaobserwowałam, że reakcja *O*-demetylacji 5-MT do serotoniny przebiega z dużo wyższą wydajnością w mikrosomach ludzkich.

Reasumując, uzyskane wyniki wskazują, że szczurze mózgowo enzymy CYP2D katalizują *O*-demetylację 5-MT do serotoniny, a spadek aktywności (w obecności inhibitora enzymu) lub genetyczny defekt CYP2D hamują istotnie tą alternatywną ścieżkę metaboliczną w mózgu. Reakcja ta zachodzi prawdopodobnie w znacznie większym stopniu u człowieka niż u gryzoni, jak wykazały badania porównawcze *in vitro*.

Powyższe wyniki badań zostały przedstawione w publikacji wchodzącej w skład cyklu prac tworzących moje osiągnięcie naukowe:

Haduch A, Bromek E, Sadakierska-Chudy A, Wójcikowski J, Daniel WA. The catalytic competence of cytochrome P450 in the synthesis of serotonin from 5-methoxytryptamine in the brain: an *in vitro* study. **Pharmacol Res.** 2013 Jan;67(1):53-9.

W celu oceny fizjologicznego i farmakologicznego znaczenia reakcji, która zamyka cykl biochemicznych przemian melatonina – serotonina w mózgu i chroni indoloetylaminy przed utlenieniem z udziałem MAO przeprowadziłam badania *in vivo*, które realizowane były w dwóch etapach.

W pierwszym etapie badań, bezpośredni substrat CYP2D do syntezy serotoniny na drodze *O*-demetylacji – 5-MT został podany bezpośrednio do mózgu (do jąder szwu). Z kolei w drugim etapie – substrat pośredni CYP2D do syntezy serotoniny – melatonina, z której w drodze deacetylacji tworzy się 5-MT, został zaaplikowany dootrzewnowo. W obu przypadkach przeprowadzano pomiar stężenia tkankowego serotoniny w strukturach mózgu (*ex vivo*) oraz pozakomórkowego stężenia neuroprzekaźnika w korze frontalnej i prążkowie metodą mikrodializy (*in vivo*).

Podanie egzogenego substratu 5-MT do jąder szwu nie wpłynęło na zmianę poziomu serotoniny w homogenatach tkankowych sporządzonych z badanych struktur (pień mózgu, podwzgórze, wzgórze, kora frontalna, prążkowie, hipokamp, kora mózgowa). Dlatego został podany inhibitor hydroksylazy tryptofanu (PCPA), który wyciszył klasyczną ścieżkę syntezy serotoniny i spowodował spadek stężenia serotoniny mierzonego *ex vivo* we wszystkich badanych strukturach. Dopiero w tych warunkach 5-MT podana domózgowo wywołała wzrost stężenia serotoniny w porównaniu z grupą otrzymującą wyłącznie PCPA, szczególnie w prążkowie, hipokampie i korze mózgowej. Natomiast podanie dootrzewnowe chininy inhibitora CYP2D przed podaniem 5-MT zapobiegało wzrostom stężenia serotoniny w

hipokampie, korze mózgowej i w mniejszym stopniu w prążkowi. Konieczność zablokowania głównej ścieżki syntezy neuroprzekaźnika wskazuje, że w warunkach fizjologicznych udział alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny w ogólnej puli neuroprzekaźnika jest niewielki, prawdopodobnie kilkuprocentowy. Jednak znaczenie fizjologiczne tej ścieżki może okazać się niezwykle istotne w przypadku deficytu hydroksylazy tryptofanu i/lub kiedy aktywność podrodziny CYP2D wzrasta pod wpływem induktorów (np. alkohol, nikotyna, leki psychotropowe) lub mutacji *CYP2D6*2*, prowadzącej do podwojenia lub zwielokrotnienia genu. Odnotowany spadek poziomu serotoniny po podaniu inhibitora CYP2D chininy w części z badanych struktur wskazuje, iż w tych rejonach mózgu kolokalizacja CYP2D i 5-MT jest większa niż w pozostałych strukturach.

Serotonina produkowana przez CYP2D w neuronach szwu może być transportowana wzdłuż aksonu do zakończeń komórek nerwowych i stamtąd uwalniana. Jak również jej produkcja z udziałem CYP2D może zachodzić bezpośrednio w zakończeniach nerwów serotonergicznym z 5-MT docierającej do nich transportem aksonalnym. W przeciwieństwie do wątroby, mózgowy cytochrom P450 występuje nie tylko w retikulum endoplazmatycznym, ale także w błonach mitochondrialnych i innych błonowych strukturach neuronów i komórek glejowych. W związku z tym, w dalszej części badań postanowiłam sprawdzić udział CYP2D w produkcji funkcjonalnej serotoniny, uwalnianej z zakończeń komórek nerwowych, w warunkach fizjologicznych i po zablokowaniu klasycznej ścieżki syntezy serotoniny przez PCPA.

Poziom pozakomórkowej serotoniny badano metodą mikrodializy *in vivo* po zaimplantowaniu kaniul dializacyjnych w prążkowi lub korze frontalnej. Mikrodializa umożliwiła obserwację zmian stężenia serotoniny po podaniu egzogenego substratu CYP2D 5-MT *in vivo* w czasie rzeczywistym. W wybranych strukturach mózgu – korze frontalnej (związanej z zaburzeniami nastroju) i prążkowi (zaangażowanym w funkcje motoryczne), stwierdza się aktywność CYP2D, a także docierają do nich projekcje z neuronów serotoninowych jąder szwu. W celu sprawdzenia poziomu serotoniny produkowanej przez CYP2D w zakończeniach nerwowych, substrat enzymu (5-MT) podawano osobno i łącznie z inhibitorem CYP2D chininą do badanych struktur poprzez kaniulę dializacyjną. Po podaniu egzogenego substratu 5-MT do kory frontalnej, zaobserwowano duży wzrost pozakomórkowego stężenia serotoniny u szczurów naiwnych, któremu zapobiegało uprzednie podanie chininy, inhibitora CYP2D. Wyniki te potwierdzają hipotezę o udziale CYP2D w syntezie serotoniny w tej strukturze mózgu. Jednak u szczurów, którym podano wcześniej

PCPA, serotonina wydaje się znikać z przestrzeni pozakomórkowej. W warunkach zablokowania klasycznej ścieżki syntezy serotoniny, 5-MT dużo słabiej podnosiła poziom serotoniny niż u szczurów naiwnych, jak również wpływ chininy na efekt wywołany przez podanie 5-MT był bardzo słaby. Prawdopodobną przyczyną zaobserwowanego zjawiska była nadwrażliwość receptorów 5-HT wywołana podaniem PCPA (powoduje nie tylko spadek syntezy serotoniny, ale i spadek jej uwalniania) oraz ich silna reaktywność na serotoninę produkowaną z 5-MT, jak i na samą 5-MT. Silna odpowiedź receptorów 5-HT_{1A/B} na zakończeniach nerwowych może hamować uwalnianie serotoniny i maskować wpływ chininy na zewnątrzkomórkową serotoninę u zwierząt po podaniu PCPA.

Wzrostowi stężenia serotoniny w korze frontalnej po podaniu 5-MT towarzyszył spadek stężenia dopaminy, który może wynikać ze złożonych interakcji między serotoniną i dopaminą (Esposito 2006; Alex and Pehek 2007; Di Giovanni et al. 2008). W interakcje te mogą być zaangażowane receptory 5-HT_{1A/B} zlokalizowane na zakończeniach neuronów dopaminergicznych, biegnących z obszaru brzusznej nakrywki (ventral tegmental area) i wywierających lokalną hamującą kontrolę uwalniania dopaminy. Ponadto, receptory 5-HT_{1A} są zlokalizowane na ciałach komórkowych neuronów piramidowych i interneuronów GABA-ergicznych kory prefrontalnej. Wpływ serotoniny na zewnątrzkomórkową dopaminę zależy od stężenia (Díaz-Mataix et al. 2005). Niskie stężenia agonistów receptorów 5-HT_{1A} podnoszą, a ich wysokie stężenia obniżają uwalnianie dopaminy. Sugeruje się, że niskie stężenia agonistów receptorów 5-HT_{1A} preferencyjnie aktywują receptory 5-HT_{1A} zlokalizowane na interneuronach GABA, co prowadzi do zniesienia hamowania neuronów piramidowych projektujących do obszaru brzusznej nakrywki i w ten sposób do wzrostu uwalniania dopaminy z zakończeń nerwów korowych. Natomiast, wysokie stężenia agonistów receptorów 5-HT_{1A} mogą pokonać ten efekt przez bezpośrednią aktywację piramidowych receptorów 5-HT_{1A} i ograniczenie pobudzającego wydzielania dopaminy w korze prefrontalnej. Dlatego wydaje się, że podwyższony poziom serotoniny i obecność wysokiego stężenia egzogennej 5-MT, która jest nioselektywnym agonistą receptora 5-HT_{1A} (Barnes and Sharp 1999) mogą stanowić wyjaśnienie przyczyn zaobserwowanego spadku zewnątrzkomórkowego stężenia dopaminy w korze prefrontalnej.

W drugiej z testowanych struktur – prążkowi, podobnie jak w korze frontalnej, 5-MT podana dostrukturalnie również podnosiła zewnątrzkomórkowy poziom serotoniny u zwierząt naiwnych, przy czym chinina nie zapobiegała u nich wzrostowi stężenia neuroprzekaźnika. Pomimo iż 5-MT w obu strukturach wywołała wzrost pozakomórkowego stężenia serotoniny,

to jednak w prążkowie udział CYP2D w syntezie serotoniny prawdopodobnie był maskowany przez receptorowe efekty podniesionego stężenia serotoniny i 5-MT, prowadzące do wzrostu uwalniania serotoniny produkowanej zarówno ścieżką klasyczną jak i alternatywną. W przeciwieństwie do kory frontalnej, 5-MT w prążkowie powodowała silny wzrost stężenia zewnątrzkomórkowego serotoniny u szczurów, którym wcześniej podano PCPA i był on hamowany przez chininę. Wydaje się zatem, że w prążkowie stosunkowo duża pula serotoniny jest tworzona przez CYP2D alternatywną ścieżką. Jednocześnie w prążkowie zaobserwowano wzrost pozakomórkowej dopaminy u zwierząt naiwnych i po PCPA, co można przypisać pobudzeniu prążkowiowych heteroreceptorów 5-HT_{2A} zlokalizowanych na dopaminergicznych zakończeniach nerwowych przez serotoninę i 5-MT lub heteroreceptorów 5-HT₄ obecnych na cholinergicznych i GABA-ergicznych neuronach, które zwiększają uwalnianie dopaminy (Barnes and Sharp 1999; Bockaert et al. 2004; Di Giovanni et al. 2008; Navailles and De Deurwaerdère 2011).

Reasumując, wyniki omówionych badań dostarczają przekonujących dowodów, które potwierdzają możliwość funkcjonowania syntezy serotoniny z 5-MT w mózgu *in vivo*. Wskazują ponadto, że ścieżka ta jest katalizowana przez mózgowy CYP2D, gdyż specyficzny inhibitor szczurzego CYP2D chinina hamował syntezę serotoniny z 5-MT.

Powyższe wyniki badań zostały przedstawione w kolejnej publikacji wchodzącej w skład cyklu prac tworzących moje osiągnięcie naukowe:

Haduch A, Bromek E, Kot M, Kamińska K, Gołombiowska K, Daniel WA. The cytochrome P450 2D-mediated formation of serotonin from 5-methoxytryptamine in the brain *in vivo*: a microdialysis study. **J Neurochem.** 2015 Apr;133(1):83-92.

Celem drugiego etapu badań *in vivo* było sprawdzenie, czy melatonina (poprzez deacetylację do 5-metoksytryptaminy) może wspomagać alternatywną ścieżkę syntezy serotoniny z 5-MT, katalizowaną przez CYP2D, jako substrat pośredni. Melatonina w mózgu pełni wiele funkcji, przede wszystkim chronobiotyczną, jak również wykazuje właściwości przeciwutleniające i działa neuroprotekcynie (Venegas et al. 2012; Acuña-Castroviejo et al. 2014). Melatoninę stosuje się w leczeniu zaburzeń snu i nastroju, również tych, które towarzyszą chorobom psychicznym, takim jak schizofrenia, depresja, sezonowa choroba afektywna (Dalton et al. 2000; Shamir et al. 2000; Singh and Jadhav 2014). W mózgu syntetyzowana jest ona głównie w szyszynce z serotoniny i stąd przedostaje się do III komory mózgu, skąd może przenikać do innych struktur mózgowych. W porze nocnej uwalniana jest z podwzgórza, a jej obecność stwierdza się także w korze i mózdzku. Melatonina

produkowana jest w większej ilości w przewodzie pokarmowym, skąd łatwo przechodzi przez barierę krew-mózg (Green et al. 1975; Venegas et al. 2012; Acuña-Castroviejo et al. 2014). Krążąca melatonina jest metabolizowana głównie w wątrobie przez enzymy cytochromu P450 podrodziny CYP1A, ale może być również deacetylowana do 5-metoksytryptaminy (Rogawski et al. 1979; Beck and Jonsson 1981; Ma et al. 2005; Hardeland 2010). 5-MT również łatwo przenika przez barierę krew-mózg (Beck and Jonsson 1981; Acuña-Castroviejo et al. 2014) i razem z 5-MT obecną w mózgu tworzy pulę bezpośredniego substratu CYP2D do produkcji serotoniny. Melatonina, zarówno produkowana w przewodzie pokarmowym, jak i podana z zewnątrz, stanowi źródło 5-MT dla organizmu, przez co pośrednio zasila alternatywną ścieżkę syntezy serotoniny katalizowaną przez CYP2D *in vivo*.

W eksperymentach po dootrzewnowym podaniu melatoniny, zbadano tkankowe (*ex vivo*) i zewnątrzkomórkowe stężenie serotoniny (*in vivo*, metodą mikrodializy mózgu). Stężenie neuroprzekaźnika było mierzone w tkankach następujących struktur mózgowych: kora mózgowa, hipokamp, jądro półleżące przegrody, prążkowie, wzgórze, podwzgórze, pień mózgu, rdzeń przedłużony i mózdzek (model A). Eksperymenty przeprowadzono na szczurach naiwnych i zwierzętach w obecności/nieobecności 5,7- dihydroktryptaminy (5,7-DHT, neurotoksyny specyficznej dla neuronów serotonergicznych) oraz pargyliny, inhibitora monoaminooksydazy (MAO). Pargylina, podana dootrzewnowo, miała zapobiec rozkładowi 5-MT (produkowanej w wątrobie z melatoniny) oraz serotoniny (syntetyzowanej z 5-MT w mózgu), w celu wzmocnienia wpływu melatoniny na poziom serotoniny w mózgu. Natomiast, 5,7-DHT, podana domózgowo, miała za zadanie zahamować klasyczną ścieżkę syntezy serotoniny z tryptofanu i magazynowanie serotoniny w zakończeniach serotonergicznych, dla uwidocznienia puli serotoniny produkowanej z 5-MT (powstającej z melatoniny w przewodzie pokarmowym) i tym samym pokazanie roli cytochromu P450 obecnego w zakończeniach neuronów serotonergicznych w produkcji serotoniny alternatywną ścieżką. Zewnątrzkomórkowe stężenie serotoniny w prążkowie (związany z funkcjami motorycznymi) było mierzone w obecności/nieobecności pargyliny użytej w modelu mikrodializy *in vivo* (model B). Zwierzęta otrzymywały również inhibitory CYP2D – chininę lub propafenon dla określenia, czy CYP2D jest zaangażowany w syntezę serotoniny z melatoniny poprzez *O*-demetylację 5-MT.

W przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowałam, że melatonina powodowała wzrost stężenia serotoniny w badanych strukturach mózgu zwierząt naiwnych, kontrolnie operowanych oraz po uszkodzeniu (lezji) wywołanym przez 5,7-DHT. W pniu mózgu,

zawierającym unerwienie serotonergiczne, melatonina wywarła silniejszy efekt u szczurów po lezji, co sugeruje obecność większej puli serotoniny powstającej ścieżką klasyczną z tryptofanu, w porównaniu z serotoniną powstałą z 5-MT (5-MT utworzonej z melatoniny) ścieżką alternatywną z udziałem CYP2D, która jest również znacznie zredukowana przez neurotoksynę. Inhibitor CYP2D chinina, podana dokomorowo, zapobiegała wzrostowi stężenia serotoniny po podaniu melatoniny w większości badanych struktur (kora mózgowa, hipokamp, prążkowie, wzgórze, podwzgórze, pień mózgu, rdzeń przedłużony i mózdzek), co wskazuje na zaangażowanie CYP2D we wzroście stężenia serotoniny produkowanej z melatoniny. Wpływ melatoniny na poziom serotoniny był niezauważalny w większości badanych struktur u zwierząt naiwnych i kontrolnie operowanych, którym podano inhibitor MAO pargylinę. Prawdopodobnie, pula serotoniny, produkowana fizjologicznie głównie z tryptofanu oraz mózgowej 5-MT, była chroniona przed MAO i dominowała nad serotoniną produkowaną pośrednio z melatoniny (poprzez deacetylację melatoniny do 5-MT i następnie *O*-demetylację przez CYP2D). Natomiast wzrost tkankowego stężenia serotoniny był widoczny we wszystkich strukturach zwierząt z lezją układu serotonergicznego, którym podano pargylinę.

Melatonina powodowała również wzrost funkcjonalnego, zewnątrzkomórkowego stężenia serotoniny w modelu mikrodializy. Zewnątrzkomórkowy poziom neuroprzekaźnika zależy nie tylko od jego produkcji w neuronie, ale i od jego uwalniania i wychwytu zwrotnego ze szczeliny synaptycznej do neuronu. Nie wiadomo jednak, czy melatonina ma na te procesy wpływ. Melatonina nie powodowała istotnego wzrostu stężenia zewnątrzkomórkowego serotoniny w prążkowie zwierząt naiwnych, ale podnosiła go u zwierząt, którym podawano wcześniej pargylinę. Inhibitor CYP2D propafenon zapobiegał wzrostowi zewnątrzkomórkowej serotoniny wywołanemu przez melatoninę, co wskazuje na zaangażowanie tego cytochromu P450 w syntezę serotoniny z 5-MT, powstałej z melatoniny.

Ponadto zaobserwowano wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia dopaminy w prążkowie pod wpływem melatoniny, któremu zapobiegał inhibitor CYP2D propafenon. Powyższe wyniki są zgodne z rezultatami wcześniejszych badań otrzymanymi po lokalnym podaniu 5-MT do prążkowie (**Haduch et al., 2015**). Potwierdzają one hipotezę, że wzrost poziomu 5-MT i serotoniny (wywołany podaniem 5-MT lub melatoniny) stymuluje heteroreceptory 5-HT₂ zlokalizowane na zakończeniach dopaminergicznych i pośrednio zwiększa uwalnianie dopaminy w tej strukturze.

Reasumując, przedstawione powyżej wyniki badań sugerują, że egzogenna melatonina, podana dootrzewnowo, wspomaga katalizowaną przez CYP2D syntezę serotoniny z 5-MT w mózgu *in vivo*, na co wskazują zaobserwowane wzrosty stężenia tkankowego i zewnątrzkomórkowego serotoniny po podaniu melatoniny, którym zapobiegały inhibitory CYP2D chinina i propafenon. CYP2D, katalizując syntezę serotoniny z 5-MT powstałej z melatoniny, zamyka cykl biochemicznych przemian serotonina→melatonina→serotonina. Ponadto można wnioskować, że metabolizm egzogennej melatoniny do serotoniny może stanowić dodatkowy komponent działania farmakologicznego melatoniny, oprócz jej profilu receptorowego i właściwości przeciwutleniających.

Przedstawione powyżej wyniki badań zostały opublikowane w pracy oryginalnej:

Haduch A, Bromek E, Wójcikowski J, Gołombiowska K, Daniel WA. Melatonin Supports CYP2D-Mediated Serotonin Synthesis in the Brain. Drug Metab Dispos. 2016 Mar;44(3):445-52.

4.3.3. Badania wpływu leków przeciwdepresyjnych na aktywności enzymu CYP2D w mózgu i wątrobie w warunkach chronicznego łagodnego stresu w zwierzęcym modelu depresji u szczura.

W poszukiwaniu wskazówek ułatwiających poznanie roli CYP2D w funkcjonowaniu mózgu, prowadzone są badania ekspresji CYP2D w różnych stanach patologicznych mózgu. Zaobserwowano m.in. spadek poziomu mRNA w korze i hipokampie oraz zmniejszenie poziomu białka Oct-1 czynnika aktywującego transkrypcję CYP2D4 w szczurzym modelu stanu padaczkowego wywołanego kwasem kainowym (Asai et al. 2018), spadek ekspresji CYP2D w stanie zapalnym po podaniu lipopolisacharydu pod wpływem cytokin (Renton and Nicholson 2000), a także w korze i mózdzku pacjentów cierpiących na chorobę Parkinsona (Mann et al. 2012).

Ostatnie badania wskazują, że stres psychologiczny może modyfikować ekspresję wątrobowego CYP2D2 w sposób zależny od rodzaju stresu (Daskalopoulos et al. 2012; Kot et al. 2017). Wyniki badań, w których uczestniczyłam, wskazują, że chroniczny łagodny stres (ang. chronic mild stress, CMS) nie wpływa istotnie na aktywność CYP2D w wątrobie (Kot et al. 2017). Podobny brak wpływu stresu na wątrobowy CYP2D odnotowano w modelu pozbawienia matki we wczesnym okresie życia (ang. early-life maternal deprivation, MD). Odmienny efekt w postaci wzrostu aktywności CYP2D zaobserwowano pod wpływem wielokrotnego stresu unieruchomienia (ang. repeated restraint stress, RS) (Daskalopoulos et

al. 2012). Do czasu przeprowadzenia przeze mnie poniżej opisanych badań brak było danych na temat wpływu stresu na CYP2D w mózgu.

W kolejnych badaniach skupiłam się na określeniu wpływu leków przeciwdepresyjnych drugiej generacji – escitalopramu i wenlafaksyny na aktywność mózgowego i dla porównania wątrobowego CYP2D, w warunkach chronicznego łagodnego stresu w zwierzęcym modelu depresji CMS. Oba leki podawano w dawce 10 mg/kg dootrzewnowo raz dziennie, zwierzętom kontrolnym oraz szczurom poddanym stresowi przez okres 5 tygodni. Aktywność CYP2D była mierzona szybkością 1'-hydroksylacji bufuralolu w mikrosomach wątrobowych oraz mikrosomach pochodzących z różnych struktur mózgowych (hipokamp, pień mózgu, podwzgórze, kora frontalna, mózdzek i reszta mózgu). Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno stres, jak i badane leki przeciwdepresyjne w różny sposób wpływają na CYP2D w mózgu i wątrobie. CMS nie wpłynął na aktywność wątrobowego CYP2D, podczas gdy chroniczne podanie escitalopramu i wenlafaksyny istotnie obniżyło aktywność i poziom białka CYP2D, zarówno u zwierząt niestresowanych, jak i stresowanych. W przeciwieństwie do wątroby, CMS w mózgu spowodował wzrost aktywności CYP2D w hipokampie. Chronicznie podane leki przeciwdepresyjne escitalopram i wenlafaksyna nie wywarły wpływu na CYP2D w mózgu zwierząt niestresowanych, ale spowodowały wzrost aktywności enzymu w korze frontalnej, podwzgórzcu i mózdzku zwierząt poddanych stresowi. Chroniczny łagodny stres stymulował aktywność CYP2D w hipokampie, co może być obronną odpowiedzią mózgu na stres. We wcześniejszych badaniach w zwierzęcym modelu depresji CMS obserwowano obniżony poziom serotoniny pod wpływem stresu (Bekris et al. 2005; Willner 2017; Chen et al. 2017). Łącząc te obserwacje można wysnuć wniosek, że pobudzenie alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny poprzez aktywację enzymu CYP2D uczestniczy w mechanizmach zmierzających do przywrócenia homeostazy neuroprzekaźnika w mózgu. Ponadto, CMS wyzwał pobudzający wpływ leków przeciwdepresyjnych na enzym, które wywołały wzrost aktywności CYP2D w korze frontalnej, podwzgórzcu i mózdzku u zwierząt stresowanych. W związku z tym, lokalny metabolizm substratów CYP2D w mózgu, takich jak neurosteroidy, neuroprzekaźniki, czy leki psychotropowe, mógł być nasilony przez CMS oraz przez podawane w czasie trwającego stresu leki przeciwdepresyjne. Aktywacja mózgowego CYP2D przez escitalopram i wenlafaksynę stanowi nowoodkrytą składową ich działania farmakologicznego zawartą we wpływie na metabolizm substratów endogennych tego enzymu w mózgu. Co ciekawe, w przeciwieństwie do mózgu, metabolizm substratów CYP2D w wątrobie może być spowolniony w trakcie chronicznego podawania

escitalopramu lub wenlafaksyny, które hamuje aktywność i zmniejsza poziom białka wątrobowego enzymu bez względu na stres. Obydwa badane leki przeciwdepresyjne, będące substratami CYP2D, mogą hamować swój metabolizm i podnosić stężenie innych jednocześnie podawanych leków metabolizowanych przez CYP2D w wątrobie. Chroniczne podanie escitalopramu lub wenlafaksyny uwidacznia możliwość ich interakcji z innymi lekami nieprzewidywalnych na podstawie rutynowych badań *in vitro*, w których obydwie leki są słabymi bezpośrednimi inhibitorami CYP2D (Ball et al. 1997; von Moltke et al. 2001).

Wyniki badań na temat wpływu leków przeciwdepresyjnych zastosowanych w modelu chronicznego łagodnego stresu (CMS) na enzym CYP2D przedstawiłam w publikacji:

Haduch A, Rysz M, Papp M, Daniel WA. The activity of brain and liver cytochrome P450 2D (CYP2D) is differently affected by antidepressants in the chronic mild stress (CMS) model of depression in the rat. **Biochem Pharmacol.** 2018 Oct;156:398-405.

4.3.4. Badania wpływu starzenia się oraz deficytu serotoniny w mózgu na aktywność CYP2D w mózgu i wątrobie samców i samic szczura.

Rezultaty wcześniej przeprowadzonych badań sugerowały, że mózgowy cytochrom P450 CYP2D może reagować zmianą aktywności również w innych specyficznych stanach fizjologicznych i patologicznych, jak wspomniano w poprzednim podrozdziale. Stąd za cel kolejnych badań przyjąłam określenie czy aktywność CYP2D zmienia się z wiekiem i w warunkach deficytu serotoniny, a więc pod wpływem czynników, które obok stresu sprzyjają rozwojowi depresji. Badania zostały przeprowadzone zarówno na samcach jak i samicach szczura, co umożliwiło sprawdzenie występowania różnic płciowych w funkcjonowaniu CYP2D w mózgu.

W starzejącym się mózgu mechanizmy naprawcze w komórkach przestają skutecznie funkcjonować z powodu działania wolnych rodników i czynników zapalnych. W związku z tym, procesy metaboliczne i neuroprzebieżność są wyraźnie zaburzone (Sato et al. 2017). Wraz z wiekiem zmniejsza się poziom neuroprzebieżników, ich receptorów oraz reakcja receptorów na neuroprzebieżniki. U starzejących się szczurów zaobserwowano obniżone poziomy dopaminy, serotoniny i noradrenaliny (Arivazhagan and Panneerselvam 2002). Zmiany te mogą być związane z produkcją neurotoksycznych substancji podczas katabolizmu neuroprzebieżników. Starzenie mózgu jest również ważnym czynnikiem zwiększającym ryzyko neurodegeneracji prowadzących do choroby Alzheimera i Parkinsona (Mann et al. 2012). Związana z wiekiem utrata neuronów i osłabienie wydajności synaptycznej może być przyczyną chorób neurologicznych i psychicznych. Postępujący w czasie złożony endogenny

proces starzenia się mózgu prowadzi do pogorszenia funkcji motorycznych, czuciowych i poznawczych. Neurochemiczne zmiany zachodzące w mózgu mogą wyzwać różne mechanizmy kompensacyjne, włączając zmiany w ekspresji i aktywności enzymów zaangażowanych w syntezę neuroprzekaźników, w tym również mózgowego CYP2D, który katalizuje alternatywne ścieżki syntezy serotoniny i dopaminy, jak wskazują dotychczasowe badania. Stąd zmiany aktywności tego enzymu mogą mieć istotne znaczenie dla starzejącego się mózgu ze zmniejszonym poziomem neuroprzekaźników.

Większość danych literaturowych na temat wpływu procesu starzenia na cytochrom P450 dotyczy enzymów funkcjonujących w wątrobie. Zaobserwowano, że aktywność wątrobowych enzymów CYP, w tym również CYP2D6, ulega obniżeniu u ludzi w podeszłym wieku (Parkinson et al. 2004; Schwartz 2007). W badaniach na zwierzętach przeprowadzonych na samcach, również odnotowano zależne od wieku różnice w aktywności cytochromu P450 w wątrobie. Wyniki badań *in vitro* metabolizmu specyficznych substratów opioidowych CYP2D i CYP3A, kodeiny i oksykodonu, z użyciem frakcji S9 wątroby szczura, sugerują osłabienie metabolizmu tych leków wraz z wiekiem, szczególnie w grupie starzejących się 18-miesięcznych szczurów (Salmin et al. 2017). Z kolei poziom mRNA CYP2D u szczurów zmniejsza się 6-krotnie począwszy od narodzin aż do 18 i 26 miesiąca życia (Xu et al. 2019). Natomiast niewiele wiadomo na temat funkcjonowania cytochromu P450 w starzejącym się mózgu. Mann i współpracownicy (2012) zaobserwowali, że poziom białka CYP2D6 w niektórych rejonach ludzkiego mózgu wzrastał wraz z wiekiem od 20 do 80 lat i był niższy u pacjentów z chorobą Parkinsona, co sugeruje jego znaczenie neuroprotektoryjne. Jednak funkcjonowanie enzymu, tj. aktywność mózgowego CYP2D, nie została w tych warunkach sprawdzona. Badania aktywności enzymu są szczególnie istotne, gdyż często obserwuje się brak korelacji pomiędzy poziomem mRNA, stężeniem białka i aktywności enzymu, które mogą być zaburzone przez procesy potranskrypcyjne lub potranslacyjne (Miksys and Tyndale 2013).

Kierując się powyższymi przesłankami, za cel kolejnych badań przyjąłam określenie wpływu starzenia oraz dużego deficytu serotoniny w mózgu na aktywność CYP2D w wybranych strukturach mózgu i dla porównania w wątrobie. Badania przeprowadzono na szczurach Dark Agouti z usuniętym poprzez knockout genem hydroksylazy tryptofanu 2 (TPH2-KO), głównego enzymu limitującego produkcję neuroprzekaźnika zasadniczą drogą z tryptofanu, u których nastąpiło drastyczne obniżenie poziomu serotoniny w mózgu (Kaplan et al. 2016).

Zaobserwowano, że aktywność CYP2D zmniejszyła się w korze frontalnej starzejących się samców szczura typu dzikiego (WT), ale wzrosła u starzejących się samców z eksperymentalnie wywołanym deficytem serotoniny (TPH2-KO) (w porównaniu ze starzejącymi się szczurami WT). W przeciwieństwie do kory frontalnej, w hipokampie, podwzgórzcu i prążkowie aktywność CYP2D wzrosła wraz z wiekiem, ale nie zmieniła się u starzejących się samców z niedoborem TPH2 (w porównaniu ze starzejącymi się samcami WT). Natomiast w wątrobie odnotowano odmiennie wyniki – spadek aktywności CYP2D u starzejących się samców WT w porównaniu z dojrzałymi zwierzętami, który pogłębił się u starzejących się zwierząt z deficytem serotoniny TPH2-KO. Ze zmianami aktywności CYP2D pozytywnie korelowały również zmiany poziomu białka enzymu.

Zmiany aktywności i poziomu białka mózgowego CYP2D pod wpływem starzenia i dużego deficytu serotoniny są zróżnicowane w zależności od rejonu mózgu. Spadek aktywności i poziomu białka CYP2D w korze frontalnej obserwowany u starzejących się samców WT w porównaniu z dojrzałymi zwierzętami, pozostaje w zgodzie z danymi wskazującymi, że kora frontalna jest szczególnie wrażliwa na proces starzenia, który prowadzi do osłabienia funkcji poznawczych (Sato et al. 2017). Spadająca z wiekiem aktywność CYP2D prowadzi do osłabienia metabolizmu substratów CYP2D, włączając endogenne neuroaktywne substancje oraz leki. Jednak przy dużym deficycie neuroprzekaźnika, spowodowanym utratą klasycznej ścieżki syntezy serotoniny (katalizowanej przez TPH2), obserwowany wzrost aktywności CYP2D w korze frontalnej wskazuje na aktywację alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny angażującej CYP2D w tym obszarze mózgu. Nasuwa się interpretacja, że może to być forma kompensacyjnej odpowiedzi na głęboki spadek poziomu neuroprzekaźnika. Przeciwnie do kory frontalnej, aktywność i poziom białka CYP2D wzrosły w hipokampie (zaangażowany w procesy uczenia się i pamięci), w podwzgórzcu (odpowiedzialnym za centralne neuroendokrynne i autonomiczne funkcje) oraz w prążkowie (związanym z funkcjami motorycznymi) i utrzymały się u samców szczura z mutacją TPH2-KO. Wzrost aktywności CYP2D w prążkowie u starzejących się samców szczura, utrzymujący się u zwierząt z deficytem TPH2, może mieć szczególne znaczenie, gdyż oprócz alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny, CYP2D katalizuje również alternatywną ścieżkę syntezy dopaminy z tyraminy w prążkowie (Bromek et al. 2010; Bromek et al. 2011), co może częściowo niwelować zaburzenia funkcji motorycznych w podeszłym wieku. Powyższe obserwacje sugerują, że CYP2D uczestniczy w mechanizmach

Załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego zaangażowanych w utrzymanie homeostazy neuroprzekaźników, w warunkach ich dużego deficytu w starzejącym się mózgu samców.

Regulacja enzymów cytochromu P450 w mózgu odbywa się w zróżnicowany sposób w zależności od rejonu mózgu, w którym są zlokalizowane (Miksys and Tyndale 2013). CYP2D nie jest dobrze poznany pod względem regulacji ekspresji w mózgu. Ostatnie badania wskazują, że zaangażowane są w nią receptory PPAR, których ekspresja w mózgu w zależności od rejonu może być wysoka i pozostaje pod kontrolą hormonu wzrostu (Zhang et al. 2018). Biorą w niej udział również hormony płciowe, które negatywnie regulują CYP2D w mózgu za pośrednictwem miRNA (Li et al. 2015). Ta hormonalna regulacja ulega osłabieniu z wiekiem (Maliković et al. 2019). Ponadto, CYP2D może być regulowany potranskrypcyjnie poprzez wzrost stabilności białka lub zahamowanie degradacji enzymu. W związku z powyższym, zaobserwowane odmienne zmiany aktywności i poziomu białka CYP2D w różnych rejonach mózgu, mogą wynikać ze złożonej, zależnej od rejonu mózgu regulacji, na którą wpływają związane z wiekiem zaburzenia neuroprzekaźnictwa oraz pojawiające się częściej stany zapalne w starzejącym się mózgu (Renton and Nicholson 2000; Satoh et al. 2017).

W opisanych powyżej badaniach po raz pierwszy wykazano zmiany funkcjonowania enzymu CYP2D w różnych rejonach mózgu podczas starzenia i w warunkach deficytu serotoniny, będące wypadkową zmian transkrypcyjnych i potranskrypcyjnych. Wyniki przedstawionych badań dotyczące aktywności CYP2D w mózgu szczura są ogólnie zgodne ze zmianami poziomu białka enzymatycznego CYP2D6, który wzrasta wraz z wiekiem w niektórych obszarach mózgu człowieka (Mann et al. 2012). Jednak w niektórych strukturach mózgu zaobserwowałam, że szczurzy CYP2D zmienia się z wiekiem w sposób odmienny od ludzkiego CYP2D6, co wskazuje na występowanie różnic międzygatunkowych. Wyniki moich badań przeprowadzonych na szczurach pokazały wzrost aktywności i białka enzymu w hipokampie, brak zmian w mózdzku i spadek w korze frontalnej starzejących się zwierząt, podczas gdy u człowieka zaobserwowano brak zmian w poziomie białka CYP2D6 w hipokampie oraz jego wzrost w mózdzku i korze frontalnej u ludzi w podeszłym wieku (lecz nie mierzono aktywności enzymu). Opisanie międzygatunkowe różnice mogą wynikać z odmiennej regulacji CYP2D w mózgu człowieka i szczura i/lub zachodzenia odmiennych potranskrypcyjnych modyfikacji w starzejącym się mózgu, które wpływają na poziom białka i aktywności enzymu.

Generalnie wyniki badań przeprowadzonych na samcach szczura wskazują, że starzenie się i deficyt TPH2 wpływają na aktywność CYP2D, co może mieć pozytywny wpływ na syntezę neuroprzekaźników w strukturach mózgu zaangażowanych w funkcje poznawcze, emocjonalne i motoryczne, ale jednocześnie negatywny wpływ na metabolizm leków w wątrobie samców.

Opisane powyżej wyniki badań zostały opublikowane w pracy oryginalnej:

Haduch A, Pukło R, Alenina N, Nikiforuk A, Popik P, Bader M, Daniel WA. The effect of ageing and cerebral serotonin deficit on the activity of cytochrome P450 2D (CYP2D) in the brain and liver of male rats. **Neurochem Int.** 2020 141:104884.

Biorąc pod uwagę wyniki przedstawionych badań, dotyczących wpływu procesu starzenia oraz deficytu serotoniny na aktywność i poziom białka CYP2D w mózgu samców szczura Dark Agouti, szczególnie interesującym było przeprowadzenie analogicznych badań u samic tego samego szczepu szczurów w celu sprawdzenia, czy istnieją różnice płciowe w funkcjonowaniu mózgowego CYP2D podczas starzenia i w warunkach niedoboru serotoniny. Jak wcześniej wspomniałam, brak jest badań na temat zmian aktywności cytochromu P450 w starzejącym się mózgu, a nieliczne doniesienia na temat wpływu podeszłego wieku na enzym wątrobowy dotyczą jedynie samców (Wauthier et al. 2007; Salmin et al. 2017; Xu et al. 2019). W badaniach wstępnych wykazałam, że aktywność CYP2D w mózgu i wątrobie dojrzałych samic Dark Agouti pozostaje niezależna od zmian hormonalnych zachodzących w trakcie cyklu estrusowego, co wskazuje, że żeńskie hormony płciowe nie są bezpośrednio zaangażowane w regulację CYP2D u samic szczurów Dark Agouti. Poszukując różnic płciowych dotyczących mózgowego CYP2D, przeanalizowałam dystrybucję aktywności CYP2D w różnych obszarach mózgu dojrzałych samic szczura typu dzikiego (WT) w porównaniu z samcami. Podobnie jak u dojrzałych samców, badanych w poprzedniej pracy, aktywność CYP2D wykazuje nierównomierne rozmieszczenie w poszczególnych rejonach mózgu samic. U obu płci CYP2D prezentuje podobny poziom aktywności w korze frontalnej, podwzgórz, wzgórz i mózdzku. Enzym ten jest najbardziej aktywny w mózdzku, a najniższą aktywność wykazuje w korze frontalnej. Najciekawszą, nową obserwacją było jednak stwierdzenie w kilku strukturach mózgu wyższej aktywności CYP2D u samic (2.5 razy wyższą w korze i prążkowie oraz 1.5 razy wyższą w pniu mózgu i hipokampie), w porównaniu z samcami. Zaobserwowane różnice w aktywności CYP2D w kilku obszarach mózgu samic i samców korelują pozytywnie z poziomami serotoniny, które są istotnie wyższe w pniu mózgu, strukturach limbicznych przodomózgowia oraz w korze mózgowej u samic niż

Załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego u samców (Carlsson and Carlsson 1988a; 1988b). Natomiast aktywność CYP2D w wątrobie samic Dark Agouti była niższa (ok. 3.5 razy) niż u samców, co jest zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na bardzo niski poziom CYP2D w tym organie u samic, w porównaniu z samcami (Schulz-Utermoehl et al. 1999).

U starzejących się samic Dark Agouti zaobserwowałam zmiany w aktywności i poziomie białka enzymatycznego CYP2D, zależne od lokalizacji enzymu w określonych rejonach mózgu. CYP2D w mózgu samic zareagował na specyficzne warunki fizjologiczne jakim jest starzenie oraz eksperymentalnie wywołany głęboki deficyt serotoniny w odmienny sposób niż u samców w przeprowadzonych poprzednio badaniach (**Haduch et al., 2020**). Aktywność i poziom białka enzymu obniżyły się w hipokampie, korze i mózdzku oraz wykazały tendencję spadkową w podwzgórzu i prążkowie starzejących się samic szczurów typu dzikiego (w porównaniu z młodymi dojrzałymi płciowo samicami WT). Negatywny wpływ starzenia na CYP2D w wielu rejonach mózgu samic stanowi przeciwny kierunek zmian do zaobserwowanych u starzejących się samców, u których aktywność i poziom białka CYP2D wzrosły w hipokampie, podwzgórzu i prążkowie, nie zmieniły się w korze mózgowej, pniu mózgu i mózdzku, a uległy obniżeniu jedynie w korze frontalnej. CYP2D nie zmieniał się z wiekiem w korze frontalnej samic, jedynej strukturze, w której poprzednio odnotowano spadek aktywności i poziomu białka enzymu u starzejących się samców. Natomiast aktywność CYP2D u samic pod wpływem wieku wzrosła jedynie w pniu mózgu, w której to strukturze badany enzym nie wykazał zmian u starzejących się samców. Powyższe wyniki badań wskazują, że obserwowany u samic spadek aktywności enzymu z wiekiem, negatywnie wpływa na lokalny metabolizm endogennych substratów CYP2D, włącznie z prekursorami neuroprzekaźników 5-metoksytryptaminą i tyraminą. Jedynie wzrost aktywności CYP2D w pniu mózgu samic może pozytywnie wpłynąć na produkcję obu neuroprzekaźników. Duży deficyt serotoniny, wywołany eksperymentalnie, potęgował negatywny wpływ wieku na aktywność CYP2D u starzejących się samic. Aktywność i poziom białka CYP2D obniżały się w korze frontalnej i podwzgórzu starzejących się samic TPH2-KO w porównaniu ze starzejącymi się samicami WT, podczas gdy w pniu mózgu spadała tylko aktywność, co wskazuje na potranslacyjną regulację enzymu. Co ciekawe, aktywność CYP2D obniżyła się w tych rejonach mózgu starzejących się samic TPH2-KO, w których enzym nie zmieniał się pod wpływem wieku (kora frontalna, podwzgórze) lub w których aktywność i poziom białka enzymu wzrosły (pień mózgu) u samic WT. Obserwacje te sugerują, że serotonina odgrywa ważną rolę w regulacji CYP2D w wymienionych rejonach mózgu samic. Negatywna

regulacja CYP2D w poszczególnych rejonach mózgu samic utrudnia organizmowi wykorzystanie alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny katalizowanej przez ten enzym w suplementacji niedoborów neuroprzekaźnika, pojawiających się z wiekiem. Powyższe obserwacje sugerują występowanie dymorfizmu płciowego w funkcjonowaniu CYP2D w mózgu. Wskazują one również, że CYP2D w mózgu samic prawdopodobnie bezpośrednio nie uczestniczy w mechanizmach zaangażowanych w utrzymanie homeostazy neuroprzekaźnika w warunkach jego znacznego niedoboru w starzejącym się mózgu, gdyż aktywność enzymu zmniejsza się w większości badanych struktur mózgowych u starzejących się samic Dark Agouti WT i TPH2-KO. Jednak biorąc pod uwagę zaangażowanie CYP2D4 (główny mózgowy CYP2D) w metabolizm allopregnanolonu poprzez katalizowanie 21-hydroksylacji tego neurosteroidu o znaczeniu neuroprotekcijnym (Funae et al. 2003; Kishimoto et al. 2004), spadek aktywności mózgowego CYP2D u samic może być pod tym względem korzystny.

Odmienne wpływ wieku i deficytu serotoniny na mózgowy CYP2D u samic i samców może częściowo wynikać ze zróżnicowanej regulacji enzymu przez hormony płciowe, których poziom z wiekiem ulega zmianie. U samic szczura poziom estradiolu we krwi obniża się z wiekiem, a poziom testosteronu pozostaje bez zmian (Fujita et al. 1990; Valle et al. 2008), podczas gdy w moich eksperymentach mózgowy CYP2D był negatywnie regulowany w różnych rejonach mózgu samic. Odmienne, u samców szczura, poziom testosteronu spada a estradiolu wzrasta z wiekiem (Fujita et al. 1990; Valle et al. 2008; Maliković et al. 2019), co współwystępuje ze wzrostem aktywności CYP2D w mózgu, jak wskazują wcześniejsze badania (**Haduch et al., 2020**). Zaobserwowane pozytywne korelacje między zmianami poziomu estradiolu i poziomów białka/aktywności CYP2D u obu płci oraz negatywna korelacja pomiędzy zmianami poziomu testosteronu i poziomów białka/aktywności enzymu u starzejących się samców wskazują na udział zmian hormonalnych w regulacji CYP2D w mózgu szczura. Szczególnie, negatywna korelacja pomiędzy zmianami poziomu testosteronu i poziomów białka/aktywności CYP2D u samców jest zgodna z innymi badaniami pokazującymi regulację mózgowego CYP2D przez testosteron poprzez miRNA u samców szczurów Wistar (Li et al. 2015). Molekularny mechanizm regulacji mózgowego CYP2D nie jest dobrze poznany. Badania przeprowadzone na mózgach samic wskazywały na regulację *CYP2D* mRNA przez hormony płciowe (Bergh and Strobel 1996; Baum and Strobel 1997). Jednak późniejsze badania wykazały, że regulacja CYP2D, która jest zależna od obszaru mózgu, może zachodzić na poziomie potranskrypcyjnym. Ostatnio sugeruje się udział receptorów jądrowych PPAR w regulacji ekspresji enzymów CYP2D, kontrolowanych przez

hormon wzrostu (Zhang et al. 2018), a z kolei hormon wzrostu pozostaje pod wpływem hormonów płciowych, których poziomy zmieniają się z wiekiem (Meinhardt and Ho 2006), jak wcześniej wspomniano. Pojawiające się z wiekiem zmiany w przewodnictwie nerwowym i rozwój stanu zapalnego w mózgu mogą również wpływać na regulację genów CYP2D na różnych poziomach ekspresji (Renton and Nicholson 2000; Satoh et al. 2017; Kuban and Daniel 2021). Stąd można wysnuć wniosek, iż zróżnicowana regulacja poziomów białka/aktywności CYP2D w mózgach starzejących się samic i samców jest wynikiem złożonej, specyficznej dla organu i płci regulacji, na którą wpływa wiek. Co ciekawe, różnice w regulacji enzymu pomiędzy samicami i samcami zaobserwowano tylko w mózgu. W wątrobie regulacja CYP2D była podobna, gdyż u obu płci starzenie negatywnie wpływało na funkcjonowanie CYP2D, redukując poziom białka i aktywności enzymu w tym organie. Deficyt serotoniny w mózgu samców powodował dalszy spadek poziomu enzymu w wątrobie, choć nie wpływał na wątrobowy CYP2D u starzejących się samic (**Haduch et al., 2021**). Zaobserwowane różnice mogą wynikać z odmiennego składu enzymów podrodziny CYP2D w wątrobie samców i samic, gdyż u samic szczurów Dark Agouti w puli wątrobowego CYP2D brak enzymów CYP2D2 i CYP2D4 (Schulz-Utermoehl et al. 1999). W przeprowadzonych przeze mnie badaniach po raz pierwszy wykazałam funkcjonowanie CYP2D w mózgu samic i porównano go z ich wątrobowym enzymem. Wyniki powyższych badań wskazują, że proces starzenia oraz duży deficyt serotoniny w mózgu wywierają ujemny efekt na aktywność i poziom białka CYP2D w mózgu i wątrobie samic. Z jednej strony, może to mieć negatywny wpływ na zdolności kompensacyjne CYP2D w syntezie serotoniny i dopaminy w strukturach mózgu zaangażowanych w funkcje poznawcze i emocjonalne, ale z drugiej strony może pozytywnie oddziaływać na poziom neurosteroidów. W wątrobie metabolizm leków będących substratami CYP2D może ulec osłabieniu u starzejących się samic, podobnie jak u samców.

Podsumowując, proces starzenia i deficyt serotoniny w mózgu wywierają odmienny wpływ na funkcjonowanie mózgowego CYP2D u samic i samców szczura. Obserwacje te wskazują na zróżnicowanie płciowe regulacji CYP2D w mózgu, która wydaje się być mniej korzystna dla samic w syntezie neuroprzekazników katalizowanej przez CYP2D, ale z drugiej strony może sprzyjać spowolnieniu metabolizmu neurosteroidów o działaniu neuroprotektynym.

Powyższe wyniki badań zostały przedstawione w najnowszej publikacji wchodzącej w skład cyklu prac tworzących moje osiągnięcie naukowe:

Haduch A, Danek P, Kuban W, Pukło R, Alenina N, Gołębiowska J, Popik P, Bader M, Daniel WA. Cytochrome P450 2D (CYP2D) enzyme dysfunction associated with aging and serotonin deficiency in the brain and liver of female Dark Agouti rats. **Neurochem Int.** **2022** Jan;152:105223. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105223. Epub 2021 Nov 13. PMID: 34780807.

Problemy badane w moich 6 pracach oryginalnych częściowo przedyskutowałam na tle literatury światowej oraz w aspekcie leczenia schorzeń psychicznych w poniższej pracy przeglądowej, która została załączona do cyklu publikacji stanowiących moje osiągnięcie naukowe: **Haduch A**, Daniel WA. The engagement of brain cytochrome P450 in the metabolism of endogenous neuroactive substrates: a possible role in mental disorders. **Drug Metab Rev.** **2018** Nov;50(4):415-429. Przedstawione dane z różnych laboratoriów naukowych i klinik wskazują na ważną rolę mózgowego cytochromu P450 w lokalnym metabolizmie endogennych substratów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania mózgu i utrzymania jego homeostazy. Zostały zdefiniowane ogólne cechy mózgowego cytochromu P450, które obejmują: specyficzną regulację enzymów odmienną niż w wątrobie, niejednorodną dystrybucję w różnych regionach mózgu/typach komórek, różną podatność na inhibicję i indukję w zależności od struktury mózgu/typu komórek, ekspresję CYP specyficznych dla mózgu. Cechy te sugerują, że mózgowy CYP, chociaż ma niską ekspresję w porównaniu z wątrobą, może uczestniczyć w wielu szlakach metabolicznych funkcjonujących w różnych obszarach mózgu, odpowiedzialnych za określone specyficzne procesy. Badania *in vitro* z użyciem rekombinowanych CYP i mikrosomów mózgowych wykazały zdolność kilku enzymów CYP do katalizowania metabolizmu wielu ważnych endogennych substratów mózgu (np. neuroprzekaźników monoaminergicznych, neurosteroidów, cholesterolu, kwasów tłuszczowych, kwasu arachidonowego), który jest często zaburzony w chorobach psychicznych i neurodegeneracyjnych. Te właściwości katalityczne CYP są skorelowane ze zmianami ekspresji/aktywności CYP obserwowanymi w mózgu zwierząt laboratoryjnych *ex vivo* oraz w mózgu ludzkim *post mortem* w warunkach fizjologicznych lub w różnych stanach patologicznych oraz z polimorfizmami genów kodujących enzymy CYP. Przeprowadzone w ostatnich latach badania *in vivo* na zwierzętach laboratoryjnych (mikrodializa mózgu) oraz na ludziach (neuroobrazowanie mózgu) potwierdzają udział CYP w metabolizmie mózgowym endogennych neuroaktywnych substratów i leków. Liczne badania sugerują powiązania mózgowego CYP i ich endogennych substratów z chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroba Parkinsona czy choroba Alzheimera. Mózgowe CYP mogą być również zaangażowane w stres i choroby psychiczne,

w tym depresja czy schizofrenia oraz w ich psychofarmakoterapię. Najwięcej związków z chorobami psychicznymi wykazano dla enzymów CYP, które jednocześnie metabolizują leki psychotropowe stosowane w ich leczeniu oraz endogenne neuroaktywne substraty. Mózgowe enzymy CYP modyfikują działanie leków w miejscu ich docelowego działania farmakologicznego w mózgu. Ujawniają w ten sposób nowy element działania terapeutycznego leków psychotropowych (poprzez wpływ na metabolizm substratów endogennych) funkcjonujący obok ich profilu receptorowego. Ostatnie badania sugerują również udział mózgowych CYP w procesach poznawczych, uczeniu się, pamięci i zachowaniu zwierząt. Badania z wykorzystaniem różnych podejść i metodologii mają na celu wyjaśnienie zaangażowania mózgowego cytochromu P450 w metabolizmie endogennym, a w konsekwencji w fizjologii, patologii i farmakologii mózgu. Dalsze badania mogą pozwolić na wykorzystanie tej nowej wiedzy na temat funkcjonowania mózgowego CYP do opracowania bardziej ukierunkowanej, skutecznej i bezpieczniejszej psychofarmakoterapii.

4.3.5. Podsumowanie

W cyklu 6 przedstawionych prac wchodzących w skład mojego dzieła habilitacyjnego został opisany udział mózgowego enzymu CYP2D w syntezie serotoniny za pośrednictwem *O*-demetylacji 5-metoksytryptaminy, która to reakcja stanowi alternatywną do głównej (hydroksylacji tryptofanu) ścieżkę syntezy neuroprzekaźnika. Po raz pierwszy wykazano funkcjonowanie alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny, katalizowanej przez CYP2D w tkance mózgowej *in vitro*, a co najważniejsze zademonstrowano metodą mikrodializy w mózgu szczura, że reakcja ta zachodzi *in vivo*. Lokalna alternatywna synteza neuroprzekaźnika może mieć istotne znaczenie w mózgu, ponieważ serotonina nie przechodzi przez barierę krew-mózg i nie może być dostarczana z zewnątrz. Co istotne, w badaniach *in vitro* wykazano, że ludzki CYP2D6, katalizujący syntezę serotoniny jest wielokrotnie bardziej wydajny w tej reakcji niż szczurze enzymy CYP2D. Sugeruje to, że ta alternatywna ścieżka syntezy serotoniny może mieć znacznie większe znaczenie w ludzkim mózgu, ale potwierdzenie tych założeń wymaga dalszych badań. Po raz pierwszy zademonstrowano również drogą eksperymentalną, że egzogenna melatonina podana dootrzewnowo, jako pośredni substrat ulegający deacetylacji do 5-metoksytryptaminy, wspomaga produkcję serotoniny z 5-MT za pośrednictwem CYP2D w mózgu *in vivo*. *O*-demetylacja 5-MT do serotoniny ma istotne znaczenie dla utrzymania właściwego poziomu indoloamin, ponieważ „oszczędza” egzogenny układ indolowy, umożliwiając jego odtwarzanie wewnątrz organizmu

w zamkniętym cyklu przemian (melatonina → 5-metoksytryptamina → serotonina → N-acetyloserotonina → melatonina). Metabolizm egzogennej melatoniny do serotoniny może stanowić dodatkowy komponent działania farmakologicznego melatoniny, oprócz jej profilu receptorowego i właściwości przeciwutleniających. W kolejno opisanych badaniach, obserwowano działanie enzymu CYP2D w warunkach chronicznego łagodnego stresu oraz chronicznego podania leków przeciwdepresyjnych escitalopramu lub wenlafaksyny w modelu CMS. Wyniki tych badań pozwoliły wzbogacić wiedzę na temat mózgowego cytochromu P450 o nowe istotne dane wskazujące, że chroniczny łagodny stres nie wpływa na aktywność CYP2D w wątrobie, ale jednocześnie stymuluje aktywność tego enzymu w hipokampie, co może stanowić obronną odpowiedź mózgu na stres. Ponadto, CMS wyzwał pobudzający wpływ leków przeciwdepresyjnych na enzym, które spowodowały wzrost aktywności CYP2D w korze frontalnej, podwzgórzu i mózdzku u zwierząt stresowanych. Aktywacja mózgowego CYP2D przez escitalopram i wenlafaksynę stanowi nowoodkrytą składową ich działania farmakologicznego zawartą we wpływie na metabolizm substratów endogennych (neurosteroidy, neuroprzekaźniki) tego enzymu w mózgu. W przeciwieństwie do mózgu, metabolizm substratów CYP2D w wątrobie może być spowolniony w trakcie chronicznego podawania escitalopramu lub wenlafaksyny, gdyż hamuje aktywność i zmniejsza poziom białka wątrobowego enzymu bez względu na stres. Chroniczne podanie escitalopramu lub wenlafaksyny, zastosowane w opisanych badaniach, uwidocznilo możliwość interakcji tych leków przeciwdepresyjnych z innymi lekami, nieprzewidywalnych na podstawie rutynowych badań *in vitro*, w których obydwie leki są słabymi bezpośrednimi inhibitorami tego enzymu. W ostatnich badaniach przeprowadzonych u samców i samic szczura, po raz pierwszy zademonstrowano zmiany funkcjonowania enzymu CYP2D w różnych rejonach mózgu podczas starzenia i w warunkach znacznego deficytu serotoniny. Warunki te istotnie wpływały na aktywność i poziom białka CYP2D u obu płci, chociaż w odmienny sposób. Zmiany CYP2D zaobserwowane u samców mogą mieć pozytywne znaczenie dla syntezy neuroprzekaźników w strukturach mózgu zaangażowanych w funkcje poznawcze, emocjonalne i motoryczne, ale jednocześnie negatywny wpływ na metabolizm leków w wątrobie. Natomiast zmiany w aktywności i poziomie białka CYP2D odnotowane u samic mogą niekorzystnie wpływać na zdolności kompensacyjne CYP2D w syntezie serotoniny i dopaminy w strukturach mózgu zaangażowanych w funkcje poznawcze i emocjonalne, ale z drugiej strony sprzyjają spowolnieniu metabolizmu neurosteroidów o działaniu

Załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego neuroprotektynym. Opisane powyżej wyniki badań dostarczają nowych danych wskazujących na zróżnicowanie płciowe regulacji CYP2D w mózgu.

Mózgowa serotonina jest związana z patofizjologią wielu schorzeń psychicznych (depresji, lęku, schizofrenii), jak również z mechanizmem działania leków psychotropowych (przeciwdepresyjnych, przeciwłękowych, przeciwpsychotycznych). Dlatego badania zawarte w moim osiągnięciu naukowym, początkowo skupione były na potencjalnych zdolnościach mózgowego CYP2D do katalizowania alternatywnej ścieżki syntezy serotoniny *in vivo* w mózgu, które zostały wykazane eksperymentalnie. Następnie badania rozwinęły się w kierunku obserwacji zachowania enzymu CYP2D w różnych warunkach *in vivo*, które mogły potwierdzić jego znaczenie w endogennym metabolizmie mózgu. Na podstawie eksperymentalnych obserwacji ekspresji i aktywności tego enzymu w różnych stanach patologicznych (chroniczny łagodny stres, deficyt serotoniny w mózgu) i w szczególnym stanie fizjologicznym jakim jest starzenie organizmu wykazałam, że odgrywa on istotną rolę w fizjologii mózgu. Jednocześnie, mózgowy CYP2D część swojej aktywności poświęca na lokalny metabolizm leków działających w ośrodkowym układzie nerwowym, dzięki czemu może modyfikować ich efekty terapeutyczne. Zatem enzym ten może stanowić nowy punkt uchwytu działania leków psychotropowych, które oprócz profilu receptorowego mogą działać poprzez wpływ na metabolizm endogeny mózgu. Wyniki badań stanowiących podstawę mojego osiągnięcia naukowego otwierają perspektywę dla opracowania nowych leków modulujących produkcję neuroprzekazników poprzez wpływ na enzym CYP2D, katalizujący alternatywne ścieżki syntezy serotoniny i dopaminy, wspomagających farmakoterapię chorób psychicznych i neurodegeneracyjnych.

4.3.6. Wykaz stosowanych skrótów

CMS – (z *ang. chronic mild stress*) chroniczny łagodny stres

CYP – cytochrom P450

DHEA – dehydroepiandrosteron

5,7-DHT - 5,7- dihydroksytryptaminy

5-HIAA – kwas 5-hydroksyindoloocetowego

5-Ht – 5-hydroksytryptamina, serotonina

MAO – (z *ang. monoamine oxidase*) oksydaza monoaminowa

MD – (z *ang. early-life maternal deprivation*) modelu pozbawienia matki we wczesnym okresie życia

5-Mt – 5-metoksytryptamina

MPTP – 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny

PCPA – p-chlorofenyloalanina, inhibitor hydroksylazy tryptofanu

PPAR – (z ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów

RS - (z ang. *repeated restraint stress*), model wielokrotnego stresu unieruchomienia

Tg-2D6 – model transgenicznych myszy z nadekspresją ludzkiego enzymu CYP2D6

TPH2 – hydroksylaza tryptofanu 2

WT – (z ang. *wild type*) dziki typ

4.3.7. Piśmiennictwo

Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan D-X, Reiter RJ. 2014. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci.* 71(16):2997–3025. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>

Alex KD, Pehek EA. 2007. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther.* 113(2):296–320. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.08.004>

Arivazhagan P, Panneerselvam C. 2002. Neurochemical changes related to ageing in the rat brain and the effect of DL-alpha-lipoic acid. *Exp Gerontol.* 37(12):1489–1494. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(02\)00122-5](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(02)00122-5)

Asai Y, Tanaka H, Nadai M, Katoh M. 2018. Status Epilepticus Decreases Brain Cytochrome P450 2D4 Expression in Rats. *J Pharm Sci.* 107(4):975–978. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.11.010>

Ball SE, Ahern D, Scatina J, Kao J. 1997. Venlafaxine: in vitro inhibition of CYP2D6 dependent imipramine and desipramine metabolism; comparative studies with selected SSRIs, and effects on human hepatic CYP3A4, CYP2C9 and CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol.* 43(6):619–626. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1997.00591.x>

Barnes NM, Sharp T. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 38(8):1083–1152. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(99\)00010-6](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(99)00010-6)

Baum LO, Strobel HW. 1997. Regulation of expression of cytochrome P-450 2D mRNA in rat brain with steroid hormones. *Brain Res.* 765(1):67–73. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00428-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00428-9)

Beck O, Jonsson G. 1981. In vivo formation of 5-methoxytryptamine from melatonin in rat. *J Neurochem.* 36(6):2013–2018. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1981.tb10827.x>

Bekris S, Antoniou K, Daskas S, Papadopoulou-Daifoti Z. 2005. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behav Brain Res.* 161(1):45–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.01.005>

Bergh AF, Strobel HW. 1996. Anatomical distribution of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P4502D forms in rat brain: effects of xenobiotics and sex steroids. *Mol Cell Biochem.* 162(1):31–41. <https://doi.org/10.1007/BF00250993>

Bertilsson L, Alm C, De Las Carreras C, Widen J, Edman G, Schalling D. 1989. Debrisoquine hydroxylation polymorphism and personality. *Lancet.* 1(8637):555. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)90094-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)90094-9)

- Bockaert J, Claeysen S, Compan V, Dumuis A. 2004. 5-HT₄ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3(1):39–51. <https://doi.org/10.2174/1568007043482615>
- Bromek E, Haduch A, Daniel WA. 2010. The ability of cytochrome P450 2D isoforms to synthesize dopamine in the brain: An in vitro study. *Eur J Pharmacol.* 626(2–3):171–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.062>
- Bromek E, Haduch A, Gołembowska K, Daniel WA. 2011. Cytochrome P450 mediates dopamine formation in the brain in vivo. *J Neurochem.* 118(5):806–815. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07339.x>
- Carlsson M, Carlsson A. 1988a. A regional study of sex differences in rat brain serotonin. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 12(1):53–61. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(88\)90061-9](https://doi.org/10.1016/0278-5846(88)90061-9)
- Carlsson M, Carlsson A. 1988b. In vivo evidence for a greater brain tryptophan hydroxylase capacity in female than in male rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 338(4):345–349. <https://doi.org/10.1007/BF00172108>
- Chen Y, Xu H, Zhu M, Liu K, Lin B, Luo R, Chen C, Li M. 2017. Stress inhibits tryptophan hydroxylase expression in a rat model of depression. *Oncotarget.* 8(38):63247–63257. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18780>
- Cheng J, Zhen Y, Miksys S, Beyoğlu D, Krausz KW, Tyndale RF, Yu A, Idle JR, Gonzalez FJ. 2013. Potential role of CYP2D6 in the central nervous system. *Xenobiotica.* 43(11):973–984. <https://doi.org/10.3109/00498254.2013.791410>
- Dalton EJ, Rotondi D, Levitan RD, Kennedy SH, Brown GM. 2000. Use of slow-release melatonin in treatment-resistant depression. *J Psychiatry Neurosci.* 25(1):48–52.
- Daskalopoulos EP, Malliou F, Rentesi G, Marselos M, Lang MA, Konstandi M. 2012. Stress is a critical player in CYP3A, CYP2C, and CYP2D regulation: role of adrenergic receptor signaling pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 303(1):E40–54. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00545.2011>
- Di Giovanni G, Di Matteo V, Pierucci M, Esposito E. 2008. Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res.* 172:45–71. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00903-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00903-5)
- Díaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, Celada P, Artigas F. 2005. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *J Neurosci.* 25(47):10831–10843. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2999-05.2005>
- Esposito E. 2006. Serotonin-dopamine interaction as a focus of novel antidepressant drugs. *Curr Drug Targets.* 7(2):177–185. <https://doi.org/10.2174/138945006775515455>
- Fujita S, Chiba M, Ohta M, Kitani K, Suzuki T. 1990. Alteration of plasma sex hormone levels associated with old age and its effect on hepatic drug metabolism in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 253(1):369–374.
- Funae Y, Kishimoto W, Cho T, Niwa T, Hiroi T. 2003. CYP2D in the brain. *Drug Metab Pharmacokinet.* 18(6):337–349. <https://doi.org/10.2133/dmpk.18.337>
- Gaedigk A, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Klein T, Leeder JS. 2017. Prediction of CYP2D6 phenotype from genotype across world populations. *Genet Med.* 19(1):69–76. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.80>
- Gjota-Ergin S, Gökçek-Saraç Ç, Adalı O, Jakubowska-Doğru E. 2018. Relationship between the hippocampal expression of selected cytochrome P450 isoforms and the animal performance in the hippocampus-dependent learning task. *Neurosci Lett.* 673:104–110. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.02.059>

- González I, Peñas-Lledó EM, Pérez B, Dorado P, Alvarez M, LLerena A. 2008. Relation between CYP2D6 phenotype and genotype and personality in healthy volunteers. *Pharmacogenomics*. 9(7):833–840. <https://doi.org/10.2217/14622416.9.7.833>
- Green AR, Hughes JP, Tordoff AF. 1975. The concentration of 5-methoxytryptamine in rat brain and its effects on behaviour following its peripheral injection. *Neuropharmacology*. 14(8):601–606. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(75\)90127-6](https://doi.org/10.1016/0028-3908(75)90127-6)
- Haduch A, Bromek E, Daniel WA. 2011. The effect of psychotropic drugs on cytochrome P450 2D (CYP2D) in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 651(1–3):51–58. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.077>
- Hardeland R. 2010. Melatonin metabolism in the central nervous system. *Curr Neuropharmacol*. 8(3):168–181. <https://doi.org/10.2174/157015910792246244>
- Hiroi T, Imaoka S, Funae Y. 1998. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun*. 249(3):838–843. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9232>
- Kaplan K, Echert AE, Massat B, Puissant MM, Palygin O, Geurts AM, Hodges MR. 2016. Chronic central serotonin depletion attenuates ventilation and body temperature in young but not adult Tph2 knockout rats. *J Appl Physiol* (1985). 120(9):1070–1081. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01015.2015>
- Kawashima H, Sequeira DJ, Nelson DR, Strobel HW. 1996. Genomic cloning and protein expression of a novel rat brain cytochrome P-450 CYP2D18* catalyzing imipramine N-demethylation. *J Biol Chem*. 271(45):28176–28180. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.28176>
- Kishimoto W, Hiroi T, Shiraishi M, Osada M, Imaoka S, Kominami S, Igarashi T, Funae Y. 2004. Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain. *Endocrinology*. 145(2):699–705. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1109>
- Kot M, Haduch A, Papp M, Daniel WA. 2017. The Effect of Chronic Treatment with Lurasidone on Rat Liver Cytochrome P450 Expression and Activity in the Chronic Mild Stress Model of Depression. *Drug Metab Dispos*. 45(12):1336–1344. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.077826>
- Kuban W, Daniel WA. 2021. Cytochrome P450 expression and regulation in the brain. *Drug Metab Rev*. 53(1):1–29. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1858856>
- Li J, Xie M, Wang X, Ouyang X, Wan Y, Dong G, Yang Z, Yang J, Yue J. 2015. Sex hormones regulate cerebral drug metabolism via brain miRNAs: down-regulation of brain CYP2D by androgens reduces the analgesic effects of tramadol. *Br J Pharmacol*. 172(19):4639–4654. <https://doi.org/10.1111/bph.13206>
- Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ. 2005. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos*. 33(4):489–494. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.002410>
- Maliković J, Feyissa DD, Kalaba P, Marouf BS, Höger H, Hartmann MF, Wudy SA, Schuler G, Lubec G, Aradska J, Korz V. 2019. Age and cognitive status dependent differences in blood steroid and thyroid hormone concentrations in intact male rats. *Behav Brain Funct*. 15(1):10. <https://doi.org/10.1186/s12993-019-0161-3>
- Mann A, Miksys SL, Gaedigk A, Kish SJ, Mash DC, Tyndale RF. 2012. The neuroprotective enzyme CYP2D6 increases in the brain with age and is lower in Parkinson's disease patients. *Neurobiol Aging*. 33(9):2160–2171. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.014>
- McMillan DM, Tyndale RF. 2015. Nicotine Increases Codeine Analgesia Through the Induction of Brain CYP2D and Central Activation of Codeine to Morphine. *Neuropsychopharmacology*. 40(7):1804–1812. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.32>
- Meinhardt UJ, Ho KKY. 2006. Modulation of growth hormone action by sex steroids. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 65(4):413–422. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02676.x>

- Miksys Sharon, Hoffmann E, Tyndale RF. 2000a. Regional and cellular induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 in rat brain by chronic nicotine treatment. *Biochemical Pharmacology*. 59(12):1501–1511. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00281-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00281-1)
- Miksys S, Rao Y, Hoffmann E, Mash DC, Tyndale RF. 2002. Regional and cellular expression of CYP2D6 in human brain: higher levels in alcoholics. *J Neurochem*. 82(6):1376–1387. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01069.x>
- Miksys S., Rao Y, Sellers EM, Kwan M, Mendis D, Tyndale RF. 2000b. Regional and cellular distribution of CYP2D subfamily members in rat brain. *Xenobiotica*. 30(6):547–564. <https://doi.org/10.1080/004982500406390>
- Miksys S, Tyndale RF. 2004. The unique regulation of brain cytochrome P450 2 (CYP2) family enzymes by drugs and genetics. *Drug Metab Rev*. 36(2):313–333. <https://doi.org/10.1081/dmr-120034149>
- Miksys S, Tyndale RF. 2013. Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *J Psychiatry Neurosci*. 38(3):152–163. <https://doi.org/10.1503/jpn.120133>
- von Moltke LL, Greenblatt DJ, Giancarlo GM, Granda BW, Harmatz JS, Shader RI. 2001. Escitalopram (S-citalopram) and its metabolites in vitro: cytochromes mediating biotransformation, inhibitory effects, and comparison to R-citalopram. *Drug Metab Dispos*. 29(8):1102–1109.
- Navailles S, De Deurwaerdère P. 2011. Presynaptic control of serotonin on striatal dopamine function. *Psychopharmacology (Berl)*. 213(2–3):213–242. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2029-y>
- Navarro-Mabarak C, Camacho-Carranza R, Espinosa-Aguirre JJ. 2018. Cytochrome P450 in the central nervous system as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Drug Metab Rev*. 50(2):95–108. <https://doi.org/10.1080/03602532.2018.1439502>
- Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM. 2004. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 199(3):193–209. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.010>
- Patel S, Dulluc J, Geffard M. 1986. Comparison of serotonin and 5-methoxytryptamine immunoreactivity in rat raphe nuclei. *Histochemistry*. 85(3):259–263. <https://doi.org/10.1007/BF00494813>
- Renton KW, Nicholson TE. 2000. Hepatic and central nervous system cytochrome P450 are down-regulated during lipopolysaccharide-evoked localized inflammation in brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 294(2):524–530.
- Rogawski MA, Roth RH, Aghajanian GK. 1979. Melatonin: deacetylation to 5-methoxytryptamine by liver but not brain aryl acylamidase. *J Neurochem*. 32(4):1219–1226. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1979.tb11049.x>
- Salmin SF, Giroux M-C, Vachon P, Beaudry F. 2017. In vitro metabolism of specific CYP2D and CYP3A opioid substrates using rat liver S9 fractions and mass spectrometry reveal a severe metabolic impairment with increasing age. *Biomed Chromatogr*. 31(2). <https://doi.org/10.1002/bmc.3786>
- Satoh A, Imai S-I, Guarente L. 2017. The brain, sirtuins, and ageing. *Nat Rev Neurosci*. 18(6):362–374. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.42>
- Schulz-Utermoehl T, Bennett AJ, Ellis SW, Tucker GT, Boobis AR, Edwards RJ. 1999. Polymorphic debrisoquine 4-hydroxylase activity in the rat is due to differences in CYP2D2 expression. *Pharmacogenetics*. 9(3):357–366. <https://doi.org/10.1097/00008571-199906000-00011>
- Schwartz JB. 2007. The Current State of Knowledge on Age, Sex, and Their Interactions on Clinical Pharmacology. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 82(1):87–96. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100226>

Shamir E, Laudon M, Barak Y, Anis Y, Rotenberg V, Elizur A, Zisapel N. 2000. Melatonin improves sleep quality of patients with chronic schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 61(5):373–377. <https://doi.org/10.4088/jcp.v61n0509>

Singh M, Jadhav HR. 2014. Melatonin: functions and ligands. *Drug Discov Today*. 19(9):1410–1418. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.04.014>

Thompson CM, Capdevila JH, Strobel HW. 2000. Recombinant cytochrome P450 2D18 metabolism of dopamine and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther*. 294(3):1120–1130.

Toselli F, Dodd PR, Gillam EMJ. 2016. Emerging roles for brain drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes in neuropsychiatric conditions and responses to drugs. *Drug Metab Rev*. 48(3):379–404. <https://doi.org/10.1080/03602532.2016.1221960>

Valle A, Santandreu FM, García-Palmer FJ, Roca P, Oliver J. 2008. The serum levels of 17beta-estradiol, progesterone and triiodothyronine correlate with brown adipose tissue thermogenic parameters during aging. *Cell Physiol Biochem*. 22(1–4):337–346. <https://doi.org/10.1159/000149812>

Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García-Corzo L, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. 2012. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res*. 52(2):217–227. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x>

Wauthier V, Verbeeck RK, Calderon PB. 2007. The effect of ageing on cytochrome p450 enzymes: consequences for drug biotransformation in the elderly. *Curr Med Chem*. 14(7):745–757. <https://doi.org/10.2174/092986707780090981>

Willner P. 2017. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress*. 6:78–93. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.08.002>

Xu S-F, Hu A-L, Xie L, Liu J-J, Wu Q, Liu J. 2019. Age-associated changes of cytochrome P450 and related phase-2 gene/proteins in livers of rats. *PeerJ*. 7:e7429. <https://doi.org/10.7717/peerj.7429>

Yu A-M, Idle JR, Byrd LG, Krausz KW, Küpfer A, Gonzalez FJ. 2003. Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6. *Pharmacogenetics*. 13(3):173–181. <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000054066.98065.7b>

Yue J, Miksys S, Hoffmann E, Tyndale RF. 2008. Chronic nicotine treatment induces rat CYP2D in the brain but not in the liver: an investigation of induction and time course. *J Psychiatry Neurosci*. 33(1):54–63.

Zhang F, Li J, Na S, Wu J, Yang Z, Xie X, Wan Y, Li K, Yue J. 2018. The Involvement of PPARs in the Selective Regulation of Brain CYP2D by Growth Hormone. *Neuroscience*. 379:115–125. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.03.009>

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

5.1. Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

W 1995 roku po ukończeniu studiów na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego i uzyskaniu stopnia magistra biologii rozpoczęłam pracę w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie. Jako pracownik zdobywający doświadczenie w nowych metodach i tematyce badań, zostałam zaangażowana w realizację grantu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych nr 4

PO5F 012 08 (1995-1997), pt. „Interakcje w klinicznych kombinacjach leków psychotropowych. Farmakokinetyka neuroleptyków pochodnych fenotiazyny podczas jednoczesnego podawania leków przeciwdepresyjnych lub karbamazepiny” pod kierownictwem prof. dr hab. Władysławy A. Daniel. W badaniach tych stwierdzono wzajemny wpływ hamujący leków przeciwdepresyjnych i neuroleptycznych na ich metabolizm, co ma znamienny wpływ na ich stężenia we krwi i mózgu. Uzyskane wyniki badań mają istotne znaczenie dla zapewnienia właściwego, bezpiecznego łączenia i dawkowania wymienionych leków w złożonych lub lekoopornych schorzeniach psychicznych. Ponadto zidentyfikowano enzymy cytochromu P450 biorące udział w metabolizmie oksydacyjnym neuroleptyków pochodnych fenotiazyny u szczura. Uzyskane dane wskazują na istotny wpływ łańcucha bocznego oraz podstawnika w pierścieniu aromatycznym fenotiazyn na preferencję zaangażowania poszczególnych enzymów w N-demetylację i sulfoksydację badanych leków. Powyższe wyniki badań mają zastosowanie dla przewidywania farmakokinetyki fenotiazyn w zależności od funkcjonalnego stanu cytochromu P450, a także interakcji metabolicznych pomiędzy neuroleptykami a innymi lekami. Wyniki tych badań zostały opisane w cyklu 8 publikacji, których zostałam współautorem dzięki swojemu zaangażowaniu:

- Daniel WA, Syrek M, **Mach A**, Wójcikowski J, Boksa J. 1997. Pharmacokinetics of thioridazine and its metabolites in blood plasma and the brain of rats after acute and chronic treatment. *Pol J Pharmacol.* 49(6):439–452.
- Daniel WA, Syrek M, **Haduch A**, Wójcikowski J. 1998. Pharmacokinetics of phenothiazine neuroleptics after chronic coadministration of carbamazepine. *Pol J Pharmacol.* 50(6):431–442.
- Daniel WA, Syrek M, **Haduch A**. 1999. Effects of selective cytochrome P-450 inhibitors on the metabolism of thioridazine. *In vitro studies.* *Pol J Pharmacol.* 51(5):435–442.
- Daniel WA, Syrek M, **Haduch A**, Wójcikowski J. 1999. The influence of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on the pharmacokinetics of thioridazine and its metabolites: *in vivo* and *in vitro* studies. *Exp Toxicol Pathol.* 51(4–5):309–314.
- Daniel WA, Syrek M, **Haduch A**, Wójcikowski J. 2000a. Different effects of amitriptyline and imipramine on the pharmacokinetics and metabolism of perazine in rats. *J Pharm Pharmacol.* 52(12):1473–1481. <https://doi.org/10.1211/0022357001777685>
- Daniel WA, Syrek M, **Haduch A**, Wójcikowski J. 2000b. Pharmacokinetics and metabolism of thioridazine during co-administration of tricyclic antidepressants. *Br J Pharmacol.* 131(2):287–295.
- Daniel WA, Syrek M, **Haduch A**, Wójcikowski J. 2001. The effect of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on the pharmacokinetics and metabolism of perazine in the rat. *J Pharm Pharmacol.* 53(4):449–461.

- Daniel W. A., Syrek M, **Haduch A.** 2002. The contribution of cytochrome P-450 isoenzymes to the metabolism of phenothiazine neuroleptics. Eur Neuropsychopharmacol. 12(5):371–377.

Zespół, w którym pracowałam otrzymał w 1998 Nagrodę Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego za wyróżniające się prace opublikowane w Polish Journal of Pharmacology w 1997 r. Z kolei praca z 2000 r. opublikowana w British Journal of Pharmacology została wyróżniona przez Dyrektora Instytutu Farmakologii PAN nagrodą za najlepszą pracę opublikowaną w 2000 r. Ponadto, w 2001 r. otrzymałam Nagrodę Zespołową Wydziału Nauk Medycznych PAN, jako współautor cyklu prac pt. „Interakcje farmakokinetyczne pomiędzy lekami przeciwdepresyjnymi i neuroleptycznymi”.

W ramach poszerzania swoich umiejętności i wiedzy w zakresie farmakokinetyki i metabolizmu leków uczestniczyłam w różnych szkoleniach. Był to, m.in. kurs pt. „Principles of pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling”, zorganizowany przez Collegium Medicum UJ w Krakowie Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej w czerwcu 1998r., a prowadzony przez prof. William J. Jusko (University at Buffalo, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences). W Hiszpanii przebywałam na szkoleniu naukowym Drug Metabolism Workshop, zorganizowanym przez European Society of Biochemical Pharmacology (Walencja, czerwiec 2002).

W tym okresie, w ramach współpracy z Zakładem Neuropsychofarmakologii oraz Zakładem Chemii Leków IF PAN w Krakowie, uczestniczyłam w badaniach na temat akumulacji 1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (TIQ) w mózgu, substancji podejrzewanej o wywoływanie Parkinsonizmu u ludzi. Wykazano, że transportery OCT (organic cation transporter), a zwłaszcza OCT3, biorą udział w procesie dystrybucji TIQ z krwi do mózgu, natomiast glikoproteina P jest zaangażowana w usuwaniu TIQ z mózgu na zewnątrz przez barierę krew/mózg. Zatem defekty genetyczne wymienionych transporterów mogą powodować gromadzenie się TIQ i innych podobnych związków w mózgu, prowadząc do neurodegeneracji. Wykonałam eksperymenty *in vitro* oraz *ex vivo* w celu określenia wpływu TIQ na aktywność CYP2D w wątrobie szczura. Hamowanie 4-hydroksylacji TIQ, katalizowanej przez CYP2D w wątrobie, nie miało wpływu na akumulację TIQ w mózgu. Wysokie stężenie TIQ w substancji czarnej indukowało aktywność CYP2D w tej strukturze, ale hamowało aktywność CYP2D w wątrobie. Wyniki tych badań zostały przedstawione w 1 publikacji:

- Lorenc-Koci E, Wójcikowski J, Kot M, **Haduch A**, Boksa J, Daniel WA. 2004. Disposition of 1,2,3,4,-tetrahydroisoquinoline in the brain of male Wistar and Dark Agouti rats. *Brain Res.* 996(2):168–179.

W 2004 r. w ramach współpracy międzynarodowej z Węgierską Akademią Nauk odbyłam szkolenie naukowe w Budapeszcie na zaproszenie prof. Laszlo Vereczkey. Był to Practical Course on “The Use of Primary Hepatocytes in the Study of the effects of Xenobiotics” zorganizowany przez Center of Excellence “Biomolecular Chemistry”, Chemical Research Center, Hungarian Academy of Sciences. W czasie szkolenia nauczyłam się nowej metody pozyskiwania i hodowli hepatocytów, służących jako model komórkowy do badania udziału ksenobiotyków w tym leków na regulację ekspresji cytochromu P450 w wątrobie. Podczas cyklu wykładów, jakie odbyły się w trakcie szkolenia, miałam okazję poszerzyć swoją wiedzę o najnowsze odkrycia w temacie udziału receptorów jądrowych w regulacji cytochromu P450, co pozwoliło mi w nowym świetle spojrzeć na badany przeze mnie do tej pory enzym i wykorzystać ją w dalszej pracy naukowej.

Kolejnym projektem badawczym, w którym aktywnie uczestniczyłam jako główny wykonawca, był grant sfinansowany przez Komitet Badań Naukowych, nr 4 PO5F 010 15 (1998 – 2001) pt. „Wpływ pojedynczych i chronicznych podań leków psychotropowych na ekspresję i aktywność enzymów cytochromu P-450 w wątrobie”, pod kierownictwem prof. dr hab. Władysławy A. Daniel. Znaczna część wyników badań uzyskanych w ramach realizacji tego projektu została zawarta w mojej pracy doktorskiej pt.: „Wpływ leków psychotropowych na aktywność enzymów rodziny drugiej i trzeciej cytochromu P450”. Wyniki tych badań prezentowałam osobiście na kilku krajowych i międzynarodowych konferencjach:

- **Haduch A.**, Wójcikowski J., Daniel W.A.: Complex interactions of antidepressant drugs with cytochrome P-450 in the rat liver. XIth Days of Neuropsychopharmacology, 27-29 May 2002, Ustroń-Jaszowiec, Poland. *Pol. J. Pharmacol.*, 2002, 54, 189.
- **Haduch A.**, Wójcikowski J., Daniel W.A.: Interactions of antidepressant drugs with cytochrome P-450 2D subfamily (CYP2D) in the rat. In vitro studies. 18th European Workshop on Drug Metabolism, 16-20 September 2002, Valencia, Spain
- **Haduch A.**, Wójcikowski J., Daniel W.A.: Effect of antidepressant drugs on cytochrome P-450 2D (CYP2D) and 3A (CYP3A) in rats. The Twelfth Days of Neuropsychopharmacology, Ustroń-Jaszowiec, May 28-30, 2003. *Pol. J. Pharmacol.*, 2003, 55, 300.
- **Haduch A.**, Daniel W.A.: The effects of chronic treatment with antidepressant drugs on the level and activity of CYP2C6, CYP2C11 and CYP3A1/2 in the rat liver. 13th International Conference on Cytochromes P450. Biochemistry, Biophysics and Drug Metabolism. June 29- July 3, 2003, Prague, Czech Republic. *Chemicke Listy (Symposia)*, 2003, 97, 175.

- **Haduch A.**, Daniel W.A.: The complex effects of neuroleptics on the level and activity of CYP2C6, CYP2C11 and CYP3A1/2 in the rat liver. The 15th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations: Chemical Biology in the Postgenomic Era. New Approaches and Applications. Mainz, Germany, July 4-9, 2004. Abstracts, 151-152.
- **Haduch A.**, Wójcikowski J., Daniel W.A.: Wpływ leków przeciwdepresyjnych na aktywność i ekspresję izoenzymów podrodziny drugiej i trzeciej cytochromu P450 w wątrobie i mózgu szczura. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Metabolizm Leków i Ksenobiotyków”, Ustroń, 5-7.09 2004. Streszczenia, 13-14.

W tym okresie dwukrotnie zdobyłam Stypendium Konferencyjne Komisji Europejskiej na udział w 13th International Conference on Cytochrome P450 (Prague, Czech Republic, 29.06.-03.07.2003) oraz w 15th International Symposium on Microsomes and Drug Oxydations: Chemical Biology in the Postgenomic Era, New Approaches and Applications. (Mainz, Germany, 04-09.07.2004).

Rezultaty badań uzyskanych w wyniku realizacji powyższego projektu zostały opublikowane z moim udziałem, z czego przed uzyskaniem stopnia doktora ukazała się drukiem 1 publikacja, a po uzyskaniu stopnia doktora 11 prac oryginalnych (wymienione w kolejnym punkcie 5.2):

- Daniel Władysława A., **Haduch A.**, Wójcikowski J. 2002. Inhibition and possible induction of rat CYP2D after short- and long-term treatment with antidepressants. *J Pharm Pharmacol.* 54(11):1545–1552.

Pracę doktorską obroniłam w 2004 r. w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie. W badaniach dotyczących pracy doktorskiej stwierdziłam złożony wpływ leków psychotropowych o różnej strukturze chemicznej i mechanizmie działania farmakologicznego na ekspresję i aktywność enzymów cytochromu P450, należących do rodziny CYP2 i CYP3 u szczura, podczas chronicznego podawania leków. Wykazałam, że leki psychotropowe mogą wpływać na aktywność cytochromu P450 na drodze interakcji bezpośredniej z enzymem (wiązanie) oraz pośrednio – poprzez inaktywujące działanie reaktywnych metabolitów lub wpływ na regulację ekspresji enzymu. Finalny efekt wpływu leku na aktywność cytochromu P450 *in vivo* zależy od rodzaju enzymu CYP i leku, czasu jego podawania oraz aktualnego stężenia w otoczeniu enzymu. Uzyskane wyniki badań mają istotne znaczenie dla przewidywania wpływu leków psychotropowych na metabolizm substancji endo- i egzogennych podczas długotrwałej terapii schorzeń psychicznych.

Brałam także udział w badaniach prowadzonych w ramach działalności statutowej Zakładu Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków w Instytucie Farmakologii PAN, a efektem tej pracy była 1 publikacja:

- **Haduch A**, Wójcikowski J, Daniel WA. 2004. Effects of chronic treatment with classic and newer antidepressants and neuroleptics on the activity and level of CYP2D in the rat brain. *Pol J Pharmacol.* 56(6):857–862.

Zapoczątkowała ona moje zainteresowanie mózgowym cytochromem P450.

Za całokształt działalności naukowej w roku 2004 otrzymałam Nagrodę Fundacji im. Jadwigi i Janusza Supniewskich, przyznaną w 2005 r.

Podsumowanie dorobku naukowego przed otrzymaniem stopnia doktora:

Liczba oryginalnych publikacji: 11

Sumaryczny impact factor: 14,688

Łączna liczba punktów MNiSW: 100

5.2. Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora zostało opublikowanych 11 prac zawierających wyniki badań, które stanowiły podstawę mojej pracy doktorskiej:

- Daniel WA, **Haduch A**, Wójcikowski J. 2005. Inhibition of rat liver CYP2D in vitro and after 1-day and long-term exposure to neuroleptics in vivo-possible involvement of different mechanisms. *Eur Neuropsychopharmacol.* 15(1):103–110.
- **Haduch A**, Ogórka T, Boksa J, Daniel WA. 2005. Interactions between neuroleptics and CYP2C6 in rat liver--in vitro and ex vivo study. *Pharmacol Rep.* 57(6):872–877.
- **Haduch A**, Wójcikowski J, Daniel WA. 2005a. Direct effects of neuroleptics on the activity of CYP2A in the liver of rats. *Pharmacol Rep.* 57(6):867–871.
- **Haduch A**, Wójcikowski J, Daniel WA. 2005b. Effect of short- and long-term treatment with antidepressant drugs on the activity of rat CYP2A in the liver. *Pharmacol Rep.* 57(6):774–781.
- Daniel WA, **Haduch A**, Syrek M, Boksa J. 2006. Direct and indirect interactions between antidepressant drugs and CYP2C6 in the rat liver during long-term treatment. *Eur Neuropsychopharmacol.* 16(8):580–587.
- **Haduch A**, Wójcikowski J, Daniel WA. 2006. The effect of tricyclic antidepressants, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and newer antidepressant drugs on the activity and level of rat CYP3A. *Eur Neuropsychopharmacol.* 16(3):178–186.
- **Haduch A**, Wójcikowski J, Daniel WA. 2007. The activity of cytochrome P450 CYP2B in rat liver during neuroleptic treatment. *Pharmacol Rep.* 59(5):606–612.
- **Haduch A**, Wójcikowski J, Daniel WA. 2008. Effect of selected antidepressant drugs on cytochrome P450 2B (CYP2B) in rat liver. An in vitro and in vivo study. *Pharmacol Rep.* 60(6):957–965.
- **Haduch A**, Wójcikowski J, Daniel WA. 2011. Effect of neuroleptics on cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in rat liver. *Pharmacol Rep.* 63(6):1491–1499.

- Wójcikowski J, **Haduch A**, Daniel WA. 2012. Effect of classic and atypical neuroleptics on cytochrome P450 3A (CYP3A) in rat liver. *Pharmacol Rep.* 64(6):1411–1418.
- Wójcikowski J, **Haduch A**, Daniel WA. 2013. Effect of antidepressant drugs on cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in rat liver. *Pharmacol Rep.* 65(5):1247–1255.

W 2009 r. wraz z Zespołem, z którym współpracowałam zostałam uhonorowana Nagrodą Zespołową Sekretarza Wydziału Nauk Medycznych PAN, za cykl prac „Mechanizmy oddziaływania pomiędzy lekami psychotropowymi i cytochromem P450” (Warszawa, 29 października 2009).

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam współpracę międzynarodową z prof. Laszlo Vereczkey, u którego wcześniej byłam na szkoleniu naukowym, a wyniki wspólnych badań na temat wpływu leków przeciwdepresyjnych na aktywność wątrobowego cytochromu P450 zostały opublikowane w 1 pracy oryginalnej:

- **Haduch Anna**, Bromek E, Kot M, Jemnitz K, Veres Z, Vereczkey L, Daniel WA. 2006. Effect of mirtazapine on the CYP2D activity in the primary culture of rat hepatocytes. *Pharmacol Rep.* 58(6):979–984.

W 2005 r. uzyskałam finansowanie z Ministerstwa Edukacji i Nauki dla opracowanego przeze mnie własnego projektu badań, pt. „Wpływ wybranych leków przeciwdepresyjnych na poziom i aktywność cytochromu P-450 2D (CYP2D) w mózgu szczura - nowy aspekt działania farmakologicznego” (grant MEIN Nr 2 PO5F 002 29, 2005-2008), który zrealizowałam w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie. Zgodnie ze światowymi trendami, rozpoczęłam nowy kierunek badań w Zakładzie Farmakokinetiki i Metabolizmu Leków IF PAN, dotyczący fizjologicznej i farmakologicznej roli cytochromu P450 zlokalizowanego w mózgu. Badania te wymagały opracowania nowych metod eksperymentalnych. W tym czasie nawiązałam nieformalną współpracę międzynarodową z prof. Yoshihiko Funae z Japonii (Department of Chemical Biology, University of Osaka, Japan Research). Dzięki jego pomocy mogłam zaadaptować i rozwinąć metody badania ekspresji i aktywności mózgowego CYP2D w Zakładzie Farmakokinetiki i Metabolizmu Leków. W badaniach zostało wykazane, że leki psychotropowe wpływają na aktywność mózgowego CYP2D w sposób odmienny niż w wątrobie, przez co nie można monitorować ich wpływu na ten enzym za pomocą obwodowych testów metabolicznych (np. mikrosomy wątrobowe, podanie substancji markerowej *in vivo*). Oddziałując na enzym bezpośrednio (Ki) lub pośrednio (zależny od struktury mózgu wpływ na ekspresję enzymu po podaniu wielokrotnym), leki psychotropowe mogą wpływać na metabolizm endogennych neuroaktywnych substratów (neuroprzekazników monoaminergicznych, neurosteroidów) oraz

lokalną biotransformację leków, przez co modyfikują swoje działanie farmakologiczne. Dodatkowo stwierdzono, że dopamina może być syntetyzowana ścieżką alternatywną w mózgu z tyraminy, przy udziale mózgowych enzymów należących do podrodziny CYP2D (u szczura CYP2D2/2D4/2D18, u człowieka CYP2D6) w badaniach *in vitro*, przeprowadzonych z udziałem enzymów rekombinowanych oraz mikrosomów mózgowych szczura oraz *in vivo* metodą mikrodializy mózgu szczura. Wyniki badań pochodzące z tego projektu zostały włączone do pracy doktorskiej Ewy Bromek, która w tym czasie była pod moją opieką. Wyniki badań wchodzących w skład projektu zaprezentowałam na kilku międzynarodowych konferencjach naukowych:

- **Haduch A.**, Bromek E., Daniel W. A.: CYP2D in the brain: the effect of antidepressant drugs. 15th International Conference on Cytochromes P450. Biochemistry, Biophysics, Functional Genomics. Bled, Słowenia, 17-21.06.07.
- **Haduch A.**, Bromek E., Gołombiowska K., Daniel W. A.: Is tyramine hydroxylation to dopamine operative in the brain? 9th World Congress of Biological Psychiatry, Paris 28.06-02.07.09. Abstracts, 2009, 321.

Rezultaty badań uzyskane w ramach realizacji mojego projektu zostały opublikowane w poniższych 3 pracach oryginalnych:

- Bromek E, **Haduch A.**, Daniel WA. 2010. The ability of cytochrome P450 2D isoforms to synthesize dopamine in the brain: An *in vitro* study. *Eur J Pharmacol.* 626(2–3):171–178.
- **Haduch A.**, Bromek E, Daniel WA. 2011. The effect of psychotropic drugs on cytochrome P450 2D (CYP2D) in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 651(1–3):51–58.
- Bromek E, **Haduch A.**, Gołombiowska K, Daniel WA. 2011. Cytochrome P450 mediates dopamine formation in the brain *in vivo*. *J Neurochem.* 118(5):806–815.

W latach 2009 - 2012 byłam zaangażowana w realizację projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, grant nr N N405 304836, pt. „Wpływ układu noradrenergicznego mózgu na ekspresję cytochromu P450 w wątrobie szczura”. Uczestniczyłam w badaniach *in vivo* przeprowadzanych na szczurach, u których wywoływano uszkodzenie układu noradrenergicznego przez podanie specyficznej neurotoksyny. Następnie po dekapitacji zwierząt i pobraniu tkanek wykonywałam szereg analiz poziomu hormonów i aktywności enzymów cytochromu P450. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że układ noradrenergiczny mózgu na drodze neurohormonalnej regulacji ogólnie pozytywnie wpływa na cytochrom P450 w wątrobie. W czasie prezentacji wyników badań podczas 17th International Congress of the Polish Pharmacological Society, Krynica Zdrój 16-18.09.2010 otrzymałam Nagrodę Zespołową Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego za plakat pt. „The role of the brain noradrenergic system in the regulation of cytochrome P450 expression in rat liver”. (*Pharmacol. Rep.*, 2010, 62, Suppl., 98-99). Wyniki badań, nad którymi

pracowałam w czasie realizacji projektu zaprezentowałam na międzynarodowej konferencji naukowej:

- **Haduch A.**, Sadakierska-Chudy A., Gołombiowska K., Daniel W. A.: The effect of the brain noradrenergic system on liver cytochrome P450: the role of neuroendocrine regulation. 24th European College of Neuropsychopharmacology Congress, Paris 3-7.09.11. Eur. Neuropsychopharmacol., 2011, 21, Suppl. 3, S266

Rezultatem mojego zaangażowania w ten projekt jest współautorstwo w 3 publikacjach oryginalnych:

- Sadakierska-Chudy A, **Haduch A**, Gołombiowska K, Daniel WA. 2010. Effects of low doses of intracerebroventricular 6-OHDA on the levels of monoaminergic neurotransmitters in rat brain structures. Pharmacol Rep. 62(6):1225–1230.
- Sadakierska-Chudy A, **Haduch A**, Rysz M, Gołombiowska K, Daniel WA. 2013. The role of brain noradrenergic system in the regulation of liver cytochrome P450 expression. Biochem Pharmacol. 86(6):800–807.
- Kot M, Sadakierska-Chudy A, **Haduch A**, Rysz M, Bromek E, Gołombiowska K, Daniel WA. 2015. The role of the dorsal noradrenergic pathway of the brain (locus coeruleus) in the regulation of liver cytochrome P450 activity. Eur J Pharmacol. 751:34–41.

W 2013 r. znalazłam się w gronie pracowników naukowych Zakładu Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków (E. Bromek, A. Haduch, J. Wójcikowski, W.A. Daniel), którzy otrzymali wyróżnienie QUALITAS (fundusz KNOW) przyznane przez Dyrektora Instytutu Farmakologii PAN, za 3 oryginalne prace naukowe, opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych.

Kolejnym projektem badawczym, w którym brałam aktywny udział jako główny wykonawca był grant współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Regionalnego Rozwoju i MNiSW w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka Nr POIG.01.01.02-12-004/09, pt. „Depresja – Mechanizmy – Terapia” DeMeTer, (2010 - 2014), kierowanego przez prof. dr hab. Krzysztofa Wędrzonego. Uczestniczyłam w realizacji Zadania Badawczego 3.4, pt.: „Znaczenie mózgowego cytochromu P450 w metabolizmie serotoniny, neuroprzekaźnika o istotnym znaczeniu w depresji. Wpływ defektu genetycznego CYP2D6”, którym kierowała prof. dr hab. Władysława A. Daniel. Projekt ten składał się z szeregu badań *in vitro* oraz *in vivo* z zastosowaniem szeregu nowoczesnych metod jak np. pomiar poziomu aktywności enzymów CYP za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w mikrosomach wątrobowych i mózgowych szczura po podaniu zwierzętom substratów CYP2D (5-metoksytryptamina, melatonina) do syntezy serotoniny oraz określenie tkankowego (*ex vivo*) i zewnątrzkomórkowego (*in vivo*) poziomu serotoniny po podaniu domózgowym tych substratów metodą mikrodializy mózgu. Wyniki badań

wchodzących w skład projektu zaprezentowałam na kilku międzynarodowych konferencjach naukowych:

- **Haduch A.**, Bromek E., Wójcikowski J., Daniel W. A.: The cytochrome P450-mediated synthesis of serotonin in the brain: An in vitro study. 28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology, Stockholm 3-7.06.12. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 2012, 15, Suppl. S1, P-10-008
- **Haduch A.**, Bromek E., Wójcikowski J., Gołmbiowska K., Daniel W. A.: Involvement of cytochrome P450 (CYP) in melatonin-serotonin transformation in the brain. The 11th World Congress of Biological Psychiatry, Kyoto 23–27.06.2013. Abstracts 2013, P-18-013.
- **Haduch A.**, Bromek E., Kot M., Wójcikowski J., Kamińska K., Gołmbiowska K., Daniel W.A.: The CYP2D-mediated alternative pathway of serotonin synthesis in the brain. 19th International Conference on Cytochromes P450. Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology. Tokyo, Japan, 12-15.06.2015. Book of Abstracts, 2015, 42.
- **Haduch A.**, Bromek E., Wójcikowski J., Gołmbiowska K., Daniel W. A.: Involvement of cytochrome P450 2D in the formation of serotonin in the brain: in vivo and in vitro study. 29th ECNP Congress, 17-20.09.2016, Vienna, Austria. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2016, 26, S262

Rezultatem mojego zaangażowania w ten projekt jest współautorstwo w poniższych 3 publikacjach oryginalnych, które stanowią część mojego osiągnięcia naukowego omówionego w rozdziale 4 autoreferatu:

- **Haduch A.**, Bromek E., Sadakierska-Chudy A., Wójcikowski J., Daniel WA. 2013. The catalytic competence of cytochrome P450 in the synthesis of serotonin from 5-methoxytryptamine in the brain: an in vitro study. *Pharmacol Res.* 67(1):53–59.
- **Haduch A.**, Bromek E., Kot M., Kamińska K., Gołmbiowska K., Daniel WA. 2015. The cytochrome P450 2D-mediated formation of serotonin from 5-methoxytryptamine in the brain in vivo: a microdialysis study. *J Neurochem.* 133(1):83–92.
- **Haduch A.**, Bromek E., Wójcikowski J., Gołmbiowska K., Daniel WA. 2016. Melatonin Supports CYP2D-Mediated Serotonin Synthesis in the Brain. *Drug Metab Dispos.* 44(3):445–452.

oraz 1 pracy poglądowej:

- **Anna Haduch A.**, Bromek E., Daniel WA. 2013. Role of brain cytochrome P450 (CYP2D) in the metabolism of monoaminergic neurotransmitters. *Pharmacol Rep.* 65(6):1519–1528.

Zostałam zaangażowana również w pracę badawczą w ramach projektu grantowego POIG Nr UDA-POIG.01.03.01-12-063/09 (2010 – 2013), pt. „Antagoniści receptora 5-HT₆: Nowoczesne leki przeciwpsychotyczne o dodatkowym działaniu prokognitywnym. ProKog”. W projekcie tym uczestniczyłam w badaniach farmakokinetycznych nowych związków, ligandów receptora 5-HT₆.

Współpracowałam z kilkoma zespołami badawczymi w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie, m.in. z Zakładem Farmakologii Uzależnień. Moja rola polegała na analizie zmian poziomu neuroprzekaźników monoaminergicznych u szczurów Wistar-Kyoto, w modelu samopodawania kokainy. W efekcie współpracy zostałam współautorem 1 publikacji oryginalnej:

- Jastrzębska J, Frankowska M, Szumiec Ł, Sadakierska-Chudy A, **Haduch A**, Smaga I, Bystrowska B, Daniel WA, Filip M. 2015. Cocaine self-administration in Wistar-Kyoto rats: a behavioral and biochemical analysis. *Behav Brain Res.* 293:62–73.

Ponadto, współpracowałam z Zakładem Biochemii Mózgu IF PAN, kierowanym przez prof. dr hab. Irenę Nalepę. Wykonywałam badania poziomu serotoniny i dopaminy i ich metabolitów w strukturach mózgu szczurów poddanych chronicznemu stresowi przepełnienia (crowding stress). Z kolei współpracując z Zakładem Neurobiologii i dr hab. Bernadeta Szewczyk, uczestniczyłam w badaniach dotyczących wpływu leków przeciwdepresyjnych w testach behawioralnych u szczurów pozbawionych opuszki węchowej oraz na diecie pozbawionej cynku. Moja rola w tych badaniach polegała na określeniu poziomu serotoniny w hipokampie i korze prefrontalnej szczurów na diecie bezcynkowej, po podaniu escitalopramu lub wenlafaksyny. Wyniki, które wspólnie opracowano zostały zaprezentowane na konferencji:

- Rafała-Ulińska A., Pochwat B., Nowak G., **Haduch A.**, Daniel W.A., Pukło R., Szewczyk B.: Chronic antidepressants treatment reverses depressive-like changes induced by olfactory bulbectomy and zinc deficiency animal model of depression. Central European Biomedical Congress, Krakow, 7-9.06.2021

Następnie zainteresowałam się nowym temat badawczym, tj. wpływem stresu na cytochrom P450, który był realizowany we współpracy z Pracownią Farmakologii Behawioralnej Zakładu Farmakologii w Instytucie Farmakologii PAN w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Mariusza Pappa. W efekcie współpracy powstały 3 publikacje oryginalne, z których druga w kolejności stanowi część mojego osiągnięcia naukowego z racji dużego udziału w pracach badawczych:

- Kot M, **Haduch A**, Papp M, Daniel WA. 2017. The Effect of Chronic Treatment with Lurasidone on Rat Liver Cytochrome P450 Expression and Activity in the Chronic Mild Stress Model of Depression. *Drug Metab Dispos.* 45(12):1336–1344.
- **Haduch A**, Rysz M, Papp M, Daniel WA. 2018. The activity of brain and liver cytochrome P450 2D (CYP2D) is differently affected by antidepressants in the chronic mild stress (CMS) model of depression in the rat. *Biochem Pharmacol.* 156:398–405.

- **Haduch A**, Bromek E, Rysz M, Pukło R, Papp M, Gruca P, Łasoń M, Niemczyk M, Daniel WA. 2020. The effects of agomelatine and imipramine on liver cytochrome P450 during chronic mild stress (CMS) in the rat. *Pharmacol Rep.* 72(5):1271–1287.

Kontynuując temat stresu jako czynnika, który może wpływać na mózgowy cytochrom P450, nawiązałam współpracę międzynarodową z dr Eliyah Dremencovem (Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Centre for Biosciences, Slovak Academy of Sciences, Dubravska cesta 9, 84005 Bratislava, Slovakia). Tematem naszych wspólnych badań jest wpływ stresu pourazowego na cytochrom P450 w wątrobie i mózgu w modelu zaburzeń stresu pourazowego (PTSD, *ang.* posttraumatic stress disorder). Moja rola w tych badaniach polega na przeprowadzeniu badań biochemicznych – izolacji frakcji mikrosomalnej wątroby i mózgu szczurów poddanych stresowi w modelu PTSD, a następnie oznaczeniu aktywności enzymu CYP2D w mikrosomach wątrobowych oraz mikrosomach z różnych struktur mózgowych. Są to badania wstępne, a współpraca trwa nadal.

Następnie uczestniczyłam we wstępnych badaniach do planowanego projektu grantowego realizowanych w ramach działalności statutowej Zakładu Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków oraz z funduszy Interdisciplinary PhD Project Molecular Science for Medicine, które zdobyła na realizację tych badań doktorantka Marta Rysz. W rezultacie mojego zaangażowania w prace badawcze zostałam współautorem 1 publikacji oryginalnej:

- Rysz M, Bromek E, **Haduch A**, Sadakierska-Chudy A, Daniel WA. 2015. Damage to the Brain Serotonergic System Increases the Expression of Liver Cytochrome P450. *Drug Metab Dispos.* 43(9):1345–1352.

Kolejnym projektem badawczym, w którym uczestniczyłam był grant finansowany przez Narodowe Centrum Nauki Nr OPUS6 2013/11/B/NZ7/04897 (2014-2017) pt. „Znaczenie serotonergicznego unerwienia podwzgórza mózgu w regulacji cytochromu P450”. W projekcie tym brałam udział w badaniach *in vivo*, w których za pomocą podań dootrzewnowych lub domózgowych neurotoksyn specyficznych dla układu serotonergicznego lub prekursora serotoniny (5-hydroksytryptofanu) wywoływane było uszkodzenie (lezja) lub aktywacja tego układu. W trakcie badań wykazano, że układ serotonergiczny mózgu uczestniczy w fizjologicznej regulacji cytochromu P450 w wątrobie na drodze neuroendokrynnej i ogólnie wywiera negatywny wpływ na ekspresję jego enzymów. Wyniki badań zaprezentowałam na międzynarodowej konferencji:

- **Haduch A.**, Bromek E., Rysz M., Wójcikowski J., Daniel W. A.: Activation of 5-HT1A receptors in the hypothalamic paraventricular nuclei (PVN) negatively regulates

cytochrome P450 expression in rat liver. 13th World Congress of Biological Psychiatry, 18-22.06.2017, Copenhagen, Denmark. Poster session P-18, Abstract, P-18-003.

Zostałam współautorem 4 publikacji oryginalnych, w których omówiono wyniki powyższych badań:

- Rysz M, Bromek E, **Haduch A**, Liskova B, Wójcikowski J, Daniel WA. 2016. The reverse role of the hypothalamic paraventricular (PVN) and arcuate (ARC) nuclei in the central serotonergic regulation of the liver cytochrome P450 isoform CYP2C11. *Biochem Pharmacol.* 112:82–89.
- Bromek E, Rysz M, **Haduch A**, Wójcikowski J, Daniel WA. 2018. Activation of 5-HT1A Receptors in the Hypothalamic Paraventricular Nuclei Negatively Regulates Cytochrome P450 Expression and Activity in Rat Liver. *Drug Metab Dispos.* 46(6):786–793.
- Bromek E, Rysz M, **Haduch A**, Daniel WA. 2019a. Serotonin Receptors of 5-HT2 Type in the Hypothalamic Arcuate Nuclei Positively Regulate Liver Cytochrome P450 via Stimulation of the Growth Hormone-Releasing Hormone/Growth Hormone Hormonal Pathway. *Drug Metab Dispos.* 47(2):80–85
- Bromek E, Rysz M, **Haduch A**, Daniel WA. 2019b. Stimulation of 5-HT2C serotonin receptor subtype in the hypothalamic arcuate nuclei (ARC) increases the cytochrome P450 activity in the liver. *Pharmacol Rep.* 71(6):1210–1212.

W 2016 otrzymałam wyróżnienie QUALITAS (fundusz KNOW) przyznane przez Dyrektora Instytutu Farmakologii PAN, jako współautorka pierwszej z wyżej wymienionych oryginalnych prac naukowych, opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie naukowym *Biochemical Pharmacology*. W 2018 r. w celu podsumowania wyników badań na temat udziału mózgowego CYP2D w alternatywnych ścieżkach syntezy neuroprzekazników monoaminergicznych oraz podsumowania aktualnego stanu wiedzy na temat roli mózgowego CYP w metabolizmie innych endogennych neuroaktywnych substratów, napisałam 1 pracę poglądową ze współautorstwem prof. dr hab. Władysławy A. Daniel, która wchodzi w skład mojego osiągnięcia naukowego (omówiona w rozdziale 4 autoreferatu):

- **Haduch A**, Daniel WA. 2018. The engagement of brain cytochrome P450 in the metabolism of endogenous neuroactive substrates: a possible role in mental disorders. *Drug Metab Rev.* 50(4):415–429.

Publikacja ta została nagrodzona przez Dyrektora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja jako wyróżniająca się w 2018 roku (5-letni IF >5).

W ramach współpracy międzynarodowej z prof. Michaelem Baderem i dr Nataszą Alenią z Centrum Medycyny Molekularnej im. Maxa Delbrücka w Berlinie oraz z Zakładem Badań Nowych Leków kierowanym przez prof. dr hab. Piotra Popikę zostały przeprowadzone badania na temat wpływu starzenia oraz deficytu serotoniny w mózgu szczurów pozbawionych genu hydroksylazy tryptofanu 2 (TPH2-KO), na aktywność i poziom białka

Załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego mózgowego enzymu CYP2D. Wyniki tych badań zaprezentowałam na kilku konferencjach międzynarodowych:

- **Haduch A.**, Pukło R., Alenina N., Nikiforuk A., Popik P., Bader M., Daniel W.A.: The effect of ageing and tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) deficit on the CYP2D activity in rat brain and liver. International Conference on cytochrome P450 (ICCP450), 23-27.06.2019, Brisbane (Australia). Book of Poster Abstract, 3C.
- **Anna Haduch**, Przemysław Danek, Wojciech Kuban, Joanna Gołębiowska, Natalia Alenina, Piotr Popik, Michael Bader, Władysława Anna Daniel. The effect of ageing and cerebral serotonin deficit on the activity and protein level of brain and liver cytochrome P450 2D (CYP2D) in female rats. 3rd Central European Biomedical Congress, Krakow, 7-9.06.2021.
- **Haduch A.**, Danek P., Kuban W., Gołębiowska J., Alenina N., Popik P., Bader M., Daniel W.A. The effects of aging and cerebral serotonin deficiency on brain and liver cytochrome P450 2D in female rats. Sex differences. 34th ECNP Congress, Lisbon, 2-5.10.2021

Podczas trwania International Conference on Cytochrome P450 (ICCP450), 23-27.06.2019, Brisbane (Australia), z racji dużego zainteresowania prezentowanym przeze mnie tematem, zostałam zaproszona do przedstawienia wyników badań w formie prezentacji ustnej. Wyniki pierwszej części badań, przeprowadzonych na samcach szczura, zostały opublikowane w 1 pracy oryginalnej wchodzącej w skład mojego osiągnięcia naukowego (omówiona w rozdziale 4 autoreferatu):

- **Haduch A**, Pukło R, Alenina N, Nikiforuk A, Popik P, Bader M, Daniel WA. 2020. The effect of ageing and cerebral serotonin deficit on the activity of cytochrome P450 2D (CYP2D) in the brain and liver of male rats. *Neurochem Int.* 141:104884.

Analogiczne badania wykonano u samic szczura, w celu sprawdzenia ewentualnych różnic płciowych w odpowiedzi mózgowego CYP2D na proces starzenia i deficytu serotoniny. Za prezentację posterową wyników tych badań, pt. „The effects of aging and cerebral serotonin deficiency on brain and liver cytochrome P450 2D in female rats. Sex differences.” otrzymałam nagrodę „ECNP Excellence Award” przyznaną przez European College of Neuropsychopharmacology podczas Kongresu ECNP w Lizbonie, 2-5.10.2021. Zostały one opublikowane w 1 pracy oryginalnej wchodzącej w skład mojego osiągnięcia naukowego (omówiona w rozdziale 4 autoreferatu):

- **Haduch A**, Danek P, Kuban W, Pukło R, Alenina N, Gołębiowska J, Popik P, Bader M, Daniel WA. 2022. Cytochrome P450 2D (CYP2D) enzyme dysfunction associated with aging and serotonin deficiency in the brain and liver of female Dark Agouti rats. *Neurochem Int.* 152:105223.

W ramach kontynuacji naszej współpracy międzynarodowej i programu mobilności naukowców w Europie ERASMUS+, odbyłam staż szkoleniowy w Max Delbrück Center for

Molecular Medicine w Berlinie w maju 2022 r. W laboratorium Bader Lab - Molecular Biology of Peptide Hormones kierowanym przez Prof. dr hab. Michaela Badera miałam okazję zapoznać się z opracowaną w Bader Lab nową metodą pomiaru poziomu serotoniny, melatoniny i metabolitów na HPLC we krwi i tkance mózgowej oraz zobaczyć nowoczesną metodę badania ekspresji genów receptorów melatoniny i syntetyzujących ją enzymów w mózgu i tkankach docelowych melatoniny. Pobrałam również tkanki (wątroba, struktury mózgu) szczurów Dark Agouti z niedoborem hydroksylazy tryptofanu 1 (TPH1) oraz szczurów typu dzikiego (WT). Cenny materiał biologiczny, który przywiozłam z Berlina, posłuży mi do dalszych badań regulacji ekspresji i aktywności cytochromu P450 przez serotoninę, w rodzimym laboratorium w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków IF PAN. Dzięki pobytowi w Max Delbrück Center for Molecular Medicine w Berlinie miałam okazję poszerzyć w bezpośredniej pracy laboratoryjnej swoje umiejętności badawcze o nowe metody. Osiągnięcia wynikające z naszej dotychczasowej współpracy międzynarodowej zachęciły obie strony do jej kontynuowania w celu przeprowadzenia wspólnych kompleksowych badań wpływu niedoboru obwodowej hydroksylazy tryptofanu 1 u szczurów TPH1-KO oraz niedoboru mózgowej hydroksylazy tryptofanu 2 u szczurów TPH2-KO (temat podjęty wcześniej i opisany w 2 publikacjach) na syntezę melatoniny i serotoniny oraz aktywność i zaangażowanie CYP2D.

Obecnie uczestniczę w realizacji projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, grant nr OPUS12 2016/23/B/NZ7/02283 (2017-2022), pt. „Rola układu glutaminergicznego mózgu w neuroendokrynnej regulacji ekspresji i aktywności cytochromu P450 w wątrobie”, jako główny wykonawca. W tym projekcie uczestniczę głównie w badaniach dotyczących wpływu selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA na wątrobowe i mózgowo enzymy cytochromu P450. Badania są w toku. W rezultacie swojego dotychczasowego zaangażowania w prace eksperymentalne zostałam współautorem 1 publikacji oryginalnej:

- Bromek E, **Haduch A**, Rysz M, Jastrzębska J, Pukło R, Wójcikowska O, Danek PJ, Daniel WA. 2021. The Selective NMDA Receptor GluN2B Subunit Antagonist CP-101,606 with Antidepressant Properties Modulates Cytochrome P450 Expression in the Liver. *Pharmaceutics*. 13(10):1643.

Powyższa publikacja została nagrodzona przez Dyrektora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja jako wyróżniająca się w 2021 roku (5-letni IF >5).

W 2022 r. uczestniczyłam w przygotowaniu 1 pracy poglądowej. Zostały w niej opisane mechanizmy, za pośrednictwem których leki psychotropowe mogą zmieniać ekspresję i aktywność cytochromu P450 w mózgu i wątrobie. Mechanizmy te funkcjonują na poziomie układu nerwowego i hormonalnego, systemu immunologicznego oraz wątroby. W opracowaniu zwrócono uwagę na fakt potwierdzony eksperymentalnie w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków IF PAN, że leki psychotropowe często wywierają odmienny wpływ na cytochrom P450 w wątrobie i mózgu. W pracy zostało przedyskutowane znaczenie tych mechanizmów dla działania leków psychotropowych oraz wzajemnych interakcji między nimi:

- Daniel WA, Bromek E, Danek PJ, **Haduch A.** 2022. The mechanisms of interactions of psychotropic drugs with liver and brain cytochrome P450 and their significance for drug effect and drug-drug interactions. *Biochem Pharmacol.* 199:115006. doi: 10.1016/j.bcp.2022.115006.

Ponadto, kieruję polskim zespołem należącym do międzynarodowego konsorcjum, które złożyło w maju 2022 r. wniosek projektu badawczego o kryptonimie **ROSSCA** na temat **“ROS-Scavenging Magnetic Nanozymes with Remote Activation for Alzheimer Disease”** w międzynarodowym konkursie **M-ERA.NET3 Call 2022** wspieranym przez Unię Europejską. W konsorcjum tym biorą udział: University of Zaragoza - Hiszpania; Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN - Polska, National Institute of Biology – Słowenia oraz Universidade de Sao Paulo – Brazylia. Projekt ROSSCA jest bardzo interesujący ze względu na swój interdyscyplinarny charakter. Obejmuje on opracowanie nanocząstek wyposażonych w syntetyczną aktywność naśladującą działanie enzymów antyoksydacyjnych katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx) i dysmutazy nadadtlenkowej (SOD), których funkcje będą aktywowane polem magnetycznym. Następnie planujemy zbadać neuroprotektoryjne działanie nowo opracowanych „magnetycznych nanozymów” *in vivo* w szczerzym modelu choroby Alzheimera. Realizacja projektu może przyczynić się do stworzenia nowej formy terapii wspomagającej leczenie choroby Alzheimera i innych chorób neurodegeneracyjnych przy wykorzystaniu nowoczesnej nanotechnologii. Dzięki zaproszeniu do międzynarodowego konsorcjum przez hiszpańskiego koordynatora dr Gerardo Goya z University of Zaragoza nawiązałam cenne kontakty z naukowcami z kilku krajów należących do sieci M-ERA.NET i zamierzam rozwijać naszą współpracę badawczą.

Podsumowanie dorobku naukowego po otrzymaniu stopnia doktora:

Liczba oryginalnych publikacji: 34

Liczba prac poglądowych: 3

Sumaryczny impact factor: 120,046

Łączna liczba punktów MNiSW: 1581

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

W trakcie swojej wieloletniej pracy naukowej w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków IF PAN sprawowałam opiekę nad przyjmowanymi nowymi pracownikami. Uczylałam ich metod, którymi posługujemy się w naszym Zakładzie, dzieląc się z nimi swoim doświadczeniem oraz wprowadzałam ich w tematykę naszych badań. Pomagałam w wykonywaniu pracy magisterskiej Tomasza Ogórka. Sprawowałam również opiekę nad studentami odbywającymi praktyki studenckie w naszym Zakładzie. Byli wśród nich student AGH z kierunku Inżynieria Biomedyczna Paweł Pieczarko (2013 r.), studentka Neurobiologii UJ Zuzanna Rauk (2018 r.). Ponadto, pomagałam mgr Ewie Bromek w badaniach do pracy doktorskiej, które zostały wykonane w znacznej części w ramach realizacji mojego projektu grantowego, pt. „Wpływ wybranych leków przeciwdepresyjnych na poziom i aktywność cytochromu P-450 2D (CYP2D) w mózgu szczura - nowy aspekt działania farmakologicznego”. Pod moją opieką swój staż odbyła u nas mgr Joanna Kujacz absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ (2017 r.). W ramach współpracy międzynarodowej, dzieliłam się również swoim doświadczeniem z mgr Evą Klaskovą z Uniwersytetu Masaryka w Brnie (Republika Czeska), pomagając jej w przeprowadzeniu w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków IF PAN doświadczeń do jej pracy doktorskiej na temat wpływu salidrozydu (leku pochodzenia roślinnego; Różeniec górski) na wątrobowy cytochrom P450.

W ramach działalności popularyzującej naukę wzięłam udział w Festiwalu Nauki w Krakowie w 2017 r., podczas którego przedstawiłam prezentację praktyczną w laboratorium Zakładu Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków, pt. „Cytochrom P450 jako maszyna enzymatyczna, która wpływa na skuteczność leku i chroni nas przed szkodliwym działaniem środowiska”. Ponadto na łamach czasopisma Wszechświat we wrześniu 2021 opublikowałam swój artykuł popularnonaukowy pt. „Mózgowy cytochrom P450 2D (CYP2D) – enzym o istotnym znaczeniu fizjologicznym i farmakologicznym”.

W marcu 2022 r. przystąpiłam do komitetu organizacyjnego Środkowoeuropejskiego Kongresu Biomedycznego (ang. Central European Biomedical Congress, CEBC). Komitet działający w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN rozpoczął prace przygotowawcze do tego prestiżowego międzynarodowego wydarzenia w świecie nauki, które odbędzie się w Krakowie w dniach 29.05 - 01.06.2023 r. Tematem wiodącym 5 edycji konferencji CEBC będzie: "Future trends in health interventions".

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.

Anna Haduch

(podpis wnioskodawcy)