

**AUTOREFERAT  
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU  
I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

**Joanna Zofia Listos**

**Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką,  
Wdział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej,  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie**

**Lublin 2017**

## SPIS TREŚCI

<b>I.</b>	<b>Posiadane dyplomy i stopnie naukowe .....</b>	<b>3</b>
<b>II.</b>	<b>Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....</b>	<b>3</b>
<b>III.</b>	<b>Osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. O stopniach .....</b>	<b>3</b>
1.	Tytuł osiągnięcia naukowego .....	3
2.	Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego .....	3
3.	<b>Omówienie celu naukowego prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego oraz uzyskanych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania</b>	<b>5</b>
3.1.	Wprowadzenie do tematyki bada .....	5
3.2.	Cel naukowy osiągnięcia badawczego .....	11
3.3.	Opis poszczególnych prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z omówieniem wyników .....	12
3.4.	Wnioski z przeprowadzonych badań.....	20
3.5.	Wykorzystanie wyników prac .....	21
4.	<b>Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych .....</b>	<b>22</b>
4.1.	Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych oraz wynikające z realizacji pracy doktorskiej .....	22
4.2.	Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych .....	23
4.3.	Współpraca z jednostkami naukowo-badawczymi .....	27
4.4.	Kierowanie projektami badawczymi oraz udział w projektach .....	28
4.5.	Międzynarodowe i krajowe nagrody oraz odznaczenia związane z działalnością naukową .....	29
4.6.	Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych .....	29
4.7.	Stáže w zagranicznych lub krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich .....	29
4.8.	Promotorstwo i opieka nad naukowymi pracami studenckimi .....	30
4.9.	Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych .....	30
<b>Piśmiennictwo</b>	.....	<b>31</b>

**I. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE**

21. 06. 2000 – stopień magistra farmacji Akademia Medyczna w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej. Praca magisterska wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką. Tytuł pracy „Wpływ ligandów receptorów adenozynowych na morfinową preferencję miejsca u szczurów”. – Promotor: prof. dr hab. Danuta Malec

5. 09. 2001 – Prawo wykonywania zawodu farmaceuty wydane przez Lubelską Okręgową Izbę Aptekarską

30. 6. 2006 – stopień doktora nauk farmaceutycznych, Akademia Medyczna w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej. Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką. Tytuł pracy „Udział układu adenozynowego w uzależniającym działaniu benzodiazepin” – Promotor: Prof. dr hab. Sylwia Fidecka

Pozostałe uzyskane dyplomy oraz szkolenia specjalistyczne przedstawione są w Załączniku 4.

**II. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

2000-2010 - asystent w Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką, Akademia Medyczna w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej.

1. 02. 2010 do chwili obecnej – adiunkt w Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej.

**III. OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCE Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DN. 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ.U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.)****1. Tytuł osiągnięcia naukowego:**

**Ocena ekspresji zmian fenotypowych u zwierząt doświadczalnych uzależnionych od morfiny - wpływ czynników endo- i egzogennych.**

Uzyskane osiągnięcia naukowe stanowiące podstawę habilitacji zostały przedstawione w monotematycznym cyklu sześciu prac doświadczalnych, opublikowanych w latach 2008-2016. Łączny współczynnik oddziaływania – IF - wymienionych prac wynosi: **IF=18,177 pkt**, łączna punktacja KBN/MNiSW wynosi: **KBN/MNiSW=182 pkt**.

**2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

**M1. Listos J, Talarek S, Fidecka S.** Involvement of adenosine receptor agonists on the development of hypersensitivity to acute doses of morphine during morphine withdrawal. *Pharmacol. Rep.* 2008, 60, 679-685.

**IF = 2,167; KBN/MNiSW = 20 pkt**

*Wkład: Mój wkład w realizację tej pracy szacuję na 85 %. Obejmował on realizację badań behawioralnych, udział w analizowaniu danych statystycznych, przygotowanie manuskryptu do publikacji. Uzyskałam zgodę wszystkich współautorów na wykorzystanie tej pracy.*

**M2. Listos J, Talarek S, Poleszak E, Wróbel A, Fidecka S.** Attenuating effect of adenosine receptor agonists on the development of behavioral sensitization induced by sporadic treatment with morphine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2011, 98, 356-361.

**IF = 2,532; KBN/MNiSW = 27 pkt**

*Wkład: Mój wkład w realizację tej pracy szacuję na 75 %. Obejmował on udział w projektowaniu badań, udział w przeprowadzaniu eksperymentów, analizę i interpretację uzyskanych wyników, przygotowanie manuskryptu do publikacji. Uzyskałam zgodę wszystkich współautorów na wykorzystanie tej pracy.*

**M3. Listos J, Talarek S, Listos P, Orzelska J, Łupina M, Fidecka S.** Effects of the adenosinergic system on the expression and acquisition of sensitization to conditioned place preference in morphine-conditioned rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2016, 389, 233-241.

**IF = 2,376; KBN/MNiSW = 25 pkt**

*Wkład: Mój wkład w realizację tej pracy szacuję na 70 %. Obejmował on planowanie eksperymentów i udział w ich realizacji, analizę i interpretację uzyskanych wyników, przygotowywanie manuskryptu do publikacji, dobór odpowiedniego piśmiennictwa. Uzyskałam zgodę wszystkich współautorów na wykorzystanie tej pracy.*

**M4. Listos J, Baranowska-Bosiacka I, Wąsik A, Talarek S, Tarnowski M, Listos P, Łupina M, Antkiewicz-Michaluk L, Gutowska I, Tkacz M, Pilutin A, Orzelska-Górka J, Chlubek D, Fidecka S.** The adenosinergic system is involved in sensitization to morphine withdrawal signs in rats-neurochemical and molecular basis in dopaminergic system. *Psychopharmacology (Berl)* 2016, 233, 2383-2397.

**IF = 3,540; KBN/MNiSW = 35 pkt**

*Wkład: Mój wkład w realizację tej pracy szacuję na 55 %. Obejmował on projektowanie badań behawioralnych, molekularnych i neurochemicznych, udział w przeprowadzaniu badań behawioralnych, udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników, udział w przygotowywaniu manuskryptu do publikacji, dobór piśmiennictwa. Uzyskałam zgodę większości współautorów na wykorzystanie tej pracy.*

**M5. Listos J, Baranowska-Bosiacka I, Talarek S, Listos P, Orzelska J, Fidecka S, Gutowska I, Kolasa A, Rybicka M, Chlubek D.** The effect of perinatal lead exposure on dopamine receptor D2 expression in morphine dependent rats. *Toxicology* 2013, 310,73-83.

**IF = 3,745; KBN/MNiSW = 35 pkt**

*Wkład: Mój wkład w realizację tej pracy szacuję na 60 %. Obejmował on udział w projektowaniu badań, realizację eksperymentów behawioralnych, udział w analizowaniu danych statystycznych i opracowywaniu wyników, udział w przygotowywaniu manuskryptu do publikacji. Uzyskałam zgodę większości współautorów na wykorzystanie tej pracy.*

**M6. Baranowska-Bosiacka I, Listos J, Gutowska I, Machoy-Mokrzyńska A, Kolasa-Wołoskiuk A, Tarnowski M, Puchalowicz K, Prokopowicz A, Talarek S, Listos P, Wąsik A, Chlubek D.** Effects of perinatal exposure to lead (Pb) on purine receptor expression in the brain and gliosis in rats tolerant to morphine analgesia. *Toxicology* 2016, 339, 19-33.

**IF = 3,817; KBN/MNiSW = 40 pkt**

*Wkład: Mój wkład w realizację tej pracy szacuję na 40 %. Obejmował on analizę statystyczną wyników badań, przygotowywanie manuskryptu do publikacji, dobór odpowiedniego piśmiennictwa. Uzyskałam zgodę większości współautorów na wykorzystanie tej pracy.*

### **3. Omówienie celu naukowego prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego oraz uzyskanych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:**

#### **3.1. Wprowadzenie do tematyki badań**

##### *Neurobiologiczne mechanizmy uzależnienia*

Uzależnienia lekowe klasyfikowane są jako przewlekła, nawracająca choroba ośrodkowego układu nerwowego (OUN), która prowadzi do zaburzeń osobowości, rozwoju chorób towarzyszących i przedwczesnego zgonu. Uzależnienia rozwijają się w wyniku długotrwałego podawania substancji uzależniających, prowadząc do uzależnienia fizycznego i psychicznego, wywoływanego m.in. przez morfinę, nikotynę czy etanol, lub psychicznego, indukowanego długotrwałym podawaniem substancji psychostymulujących, np. kokainy czy amfetaminy. Uzależnienie fizyczne, związane jest z powstawaniem zmian neuroadaptacyjnych w OUN, zarówno na poziomie molekularnym, jak i komórkowym (Koob i wsp., 2004, Robinson i Kolb, 2004). Zmiany te są odpowiedzialne za pojawienie się u ludzi i zwierząt, charakterystycznych dla danej substancji uzależniającej objawów odstawiennych (*the withdrawal signs*), których rodzaj i nasilenie zależą od różnych czynników. Takimi czynnikami mogą być: rodzaj stosowanej substancji i jej dawka, czas nadużywania, wiek pacjenta czy wiek pierwszego użycia substancji (Goodman, 2008). Uzależnienie psychiczne określane jest jako przymus przyjmowania substancji w celu poprawy samopoczucia. U ludzi cechą charakterystyczną tego typu uzależnienia jest nasilenie zachowań mających na celu poszukiwanie substancji, a także osłabienie woli pacjenta, kompulsywne przyjmowanie substancji mimo wiedzy o jej szkodliwości, czy występowanie natręctw myślowych utrzymujących się i nawracających nawet po wieloletniej abstynencji.

Działanie nagradzające różnych substancji uzależniających związane jest z pobudzeniem struktur układu mezolimbicznego, tj. obszaru brzusznej nakrywki (*ventral tegmental area*) i jądra półleżącego przegrody (*nucleus accumbens septi*). Stymulacja struktur układu mezolimbicznego powoduje wzrost stężenia dopaminy w jądrze półleżącym (Di Chiara, 2000), co warunkuje odczuwanie przyjemności po podaniu substancji. Do układu mezolimbicznego docierają również impulsy pochodzące z innych struktur mózgu, takich jak, np: brzuszne prążkowie (*ventral striatum*), hipokamp (*hippocampus*), kora przedczołowa (*prefrontal cortex*) czy ciało migdałowate (*amygdala*) (Koob i wsp., 2004). Drażnienie tych struktur także prowadzi do wzrostu wydzielania dopaminy w układzie mezolimbicznym. Mimo, że w działaniu substancji uzależniających kluczową rolę odgrywa dopamina, wiele neuroprzebiegów i neuromodulatorów OUN może w sposób pośredni wpływać na wydzielanie dopaminy, a tym samym modulować działanie substancji uzależniających. Do tych substancji należą glutaminian, serotonina, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA), noradrenalina, adenozylna, tlenek azotu, oreksyny i inne (Goodman, 2008).

##### *Morfina jako substancja uzależniająca*

Morfina jest jedną z substancji o najsilniejszym potencjale uzależniającym, która wykorzystywana jest w leczeniu w zwalczaniu bólu ostrego i przewlekłego. Morfina oraz inne substancje opioidowe są także nadużywane w celach pozamedycznych prowadząc do uzależnienia fizycznego i psychicznego, rozwoju chorób współtowarzyszących oraz przedwczesnego zgonu (Nutt i wsp., 2010). Co więcej, inne substancje pobudzające receptory opioidowe, takie jak heroina czy kodeina, są również często nadużywane. Chociaż ich potencjał uzależniający jest różny od morfiny, ich mechanizm jest podobny, związany z wpływem na receptory opioidowe (Bodnar, 2016). Dokładne poznanie mechanizmów zaangażowanych w uzależniające działanie morfiny jest istotne nie tylko dla uzależnienia od morfiny ale również dla określenia mechanizmów uzależnienia od innych substancji opioidowych, w tym heroiny czy kodeiny. Dlatego w badaniach eksperymentalnych morfina może być wykorzystywana jako substancja

referencyjna, której efekty działania mogą być odniesione do całej grupy substancji pobudzających receptory opioidowe.

Działanie farmakologiczne morfiny, związane jest przede wszystkim ze stymulacją receptorów opioidowych typu  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  (Bodnar, 2016). Receptory te znajdują się, m.in. w obszarach OUN związanych z przekazywaniem impulsów bólowych, głównie w istocie szarej okołowodociągowej (*periaqueductal grey area*) oraz w rogach tylnych rdzenia kręgowego (*dorsal horn of the spinal cord*). Pobudzenie receptorów leżących w obrębie tych struktur, szczególnie receptorów typu  $\mu$ , indukuje działanie przeciwbólowe morfiny. Receptory opioidowe znajdują się także w strukturach układu mezolimbicznego oraz w korze mózgu (*cortex*), a więc w obszarach zaangażowanych w działanie nagradzające substancji uzależniających. Stymulacja receptorów  $\mu$ , a szczególnie tych, zlokalizowanych na zakończeniach GABAergicznym w obszarze brzusznej nakrywki, powoduje zahamowanie wydzielania endogennego GABA. Prowadzi to do odhamowania neuronów dopaminergicznym, wzrostu wydzielania dopaminy w jądrze półleżącym i uczucia euforii, które sprzyja powstawaniu uzależnienia (Wise i Rompore, 1989).

Przewlekłe podawanie morfiny prowadzi do rozwoju uzależnienia fizycznego i psychicznego (Koob i wsp., 2004, Goodman, 2008). Uzależnienie fizyczne manifestuje się jako pojawienie się charakterystycznych objawów odstawiennych po zaprzestaniu długotrwałego jej podawania oraz rozwój tolerancji na działanie farmakologiczne (np. przeciwbólowe) morfiny. Typowymi objawami abstynencji po odstawieniu morfiny u ludzi są kichanie, katar, kaszel, bóle brzucha, biegunka, jądłowstręt, lęk i inne (Evans i Cahill, 2016). U zwierząt pojawiają się wyskoki (*jumpings*), drżenia łap (*paw tremors*), zgrzytanie zębami (*teeth chattering*) oraz potrząsanie głową (*wet dog shakes*) i biegunka (*diarrhoea*). W badaniach eksperymentalnych morfinowych objawów odstawiennych analizowana jest intensywność zespołu odstawiennego na podstawie ilości powyższych epizodów. Morfinowe objawy odstawiennego mogą być wywołane poprzez nagłe odstawienie długotrwałego podawania morfiny lub przez podanie antagonisty receptorów opioidowych – naloksonu (Diaz i wsp., 2003, Done i wsp., 1992). W tym przypadku zespół odstawienny rozwija się szybciej i jest bardziej intensywny. Z kolei tolerancja na działanie morfiny definiowana jest jako potrzeba przyjmowania coraz większej dawki morfiny w celu wywołania tego samego efektu farmakologicznego (Koob i wsp., 2004, Goodman, 2008). W badaniach eksperymentalnych u zwierząt doświadczalnych ocenę rozwoju morfinowej tolerancji prowadzi się najczęściej w oparciu o jej działanie nocyceptywne, które mierzone jest w testach, np. w teście zanurzenia ogona (*the immersion test*) lub w teście gorącej płytki (*the hot plate test*).

### *Morfina i jej molekularny mechanizm działania*

Połączenie endogennego (cząsteczka endorfiny) lub egzogennego (cząsteczka endorfiny) ligandu z receptorami opioidowymi prowadzi, do aktywacji białka Go lub Gi. Białko G zbudowane jest z trzech podjednostek:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Wiązanie liganda z receptorem opioidowym powoduje aktywację receptora poprzez wiązanie się guanozyno-5'-trifosforan (GTP) z podjednostką  $\alpha$ , a następnie kompleks  $\alpha$ -GTP oddysocjowuje od podjednostek-dimeru  $\beta\gamma$ . Oba kompleksy podjednostek,  $\alpha$ -GTP oraz dimer  $\beta\gamma$ , uczestniczą w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału (*cell signalling*). Prowadzą do aktywacji wtórnych neuroprzekazników, tj. do zahamowania aktywności cykazy adenylanowej i zmniejszenia stężenia cyklicznego adenozyonomonofosforanu (cAMP) w komórce (Sharma i wsp., 1977), a następnie do obniżenia aktywności fosfolipazy A. Indukują także aktywację kanałów potasowych (North i wsp., 1987), co prowadzi do zwiększenia hiperpolaryzacji komórki, a więc do zmniejszenia jej pobudliwości (Law i wsp., 2000). Powstający w wyniku stymulacji receptora dimer  $\beta\gamma$  bezpośrednio blokuje otwieranie kanałów wapniowych, zmniejsza stężenie wapnia (Moises i wsp., 1994) w komórce, a przez to prowadzi do zahamowania wydzielania innych neuroprzekazników. Wpływ stymulacji receptorów opioidowych na aktywność kanałów potasowych i wapniowych potwierdzony był wielokrotnie w różnych strukturach mózgu (hipokamp, jądro miejsca sinawego, obszar brzusznej nakrywki i inne) i przez wiele lat mechanizm ten był uważany za kluczową reakcję wynikającą ze stymulacji receptorów opioidowych (Al-Hasani i Bruchas, 2011).

Nowsze dane eksperymentalne wskazują jednak, że stymulacja receptorów opioidowych przez morfinę i inne ligandy może mieć wpływ na inne szlaki sygnalizacyjne, np. szlak fosfolipazy C (Xie i wsp., 1999) szlak kinaz aktywowanych mitogenem (MAP kinazy) (Law i wsp., 2004) oraz na aktywność białka  $\beta$ -arestyny (Li i wsp., 2009), co prowadzi do dalszych przemian wewnątrzkomórkowych. Tak więc, istotne pod względem klinicznym działania farmakologiczne morfiny, indukowane jednorazowym podaniem tej substancji, związane są z wielokierunkowymi molekularnymi mechanizmami zachodzącymi wewnątrz komórki.

*Mechanizmy biorące udział w powstawaniu  
morfinowych objawów odstawiennych, tolerancji i sensytyzacji behawioralnej*

Mimo licznych badań, mechanizmy zaangażowane w powstawanie uzależnienia fizycznego od morfiny nie zostały w pełni poznane. Wiadomo, że bezpośrednią przyczyną pojawienia się morfinowych objawów odstawiennych jest nagły spadek stężenia dopaminy w jądrze półleżącym (Koob, 1989). Wiadomo również, że w powstawaniu objawów odstawiennych uczestniczą także inne neuroprzekaźniki i neuromodulatory. Oprócz zmniejszonego wydzielania dopaminy, podczas objawów odstawiennych obserwowano wzrost wydzielania noradrenaliny (Fox i wsp., 2016), glutaminianu (Sepulveda i wsp., 1998) w układzie mezo limbicznym. Wykazano również zmiany w ekspresji receptorów serotoninowych (Zhang i wsp., 2016), wzrost ekspresji receptorów oreksynowych (Zhou i wsp., 2006), wzrost stężenia kortyzolu we krwi (Matinfar i wsp., 2013). Ponadto, obserwowano zmiany w przewodności wewnątrzkomórkowej, tj. znaczny wzrost stężenia cAMP w komórce (Meyer i wsp., 2012) czy deregulację szlaku MAP kinaz (ERK 1/2) (Bilecki i wsp., 2005, Cao i wsp., 2005).

Mechanizmy leżące u podłoża morfinowej tolerancji nie są w pełni poznane. Początkowo uważano, że rozwój tolerancji na działanie morfiny związany był ze spadkiem ekspresji receptorów dopaminergicznych (Dang i Christie, 2012). Obecnie wiadomo, że nie tyle zjawisko „down-regulacji” receptorów, ale ich desensytyzacja odgrywa ważną rolę w rozwoju tolerancji. Desensytyzacja receptorów jest skutkiem powstawania zmian adaptacyjnych polegających na zwiększeniu aktywności cyklicznej adenylationowej i wzrostu cAMP w komórce co, pośrednio, ma wpływ na aktywność białka wiążącego z elementem odpowiedzi na cAMP – CREB (*cAMP response element-binding protein*). Ponadto, wyniki badań eksperymentalnych pokazują, że również inne, wewnątrzkomórkowe mechanizmy mogą być odpowiedzialne za rozwój tolerancji na działanie morfiny, takie jak endocytoza receptorów opioidowych (Whistler i wsp., 1999), deregulacja poziomu  $\beta$ -arestyny 1 oraz  $\beta$ -arestyny 2 w komórce (Bohn i wsp., 1999, Bohn i wsp., 2000, Fan i wsp., 2003), czy zmiana na aktywności MAP kinaz (ERK1/2) (Macey i wsp., 2009), co prowadzi do długotrwałych zmian w sygnalizacji komórki (Al-Hasani i Bruchas, 2011). W rozwoju tolerancji na działanie morfiny dochodzi także do zaburzenia interakcji pomiędzy receptorami opioidowymi typu  $\mu$  a glutaminianergicznymi typu N-metylo-D-asparaginowymi (NMDA), zależnymi od białka supresorowego - HINT1 (Sánchez-Blázquez i wsp., 2013).

Przerwywane podawanie substancji uzależniającej u zwierząt prowadzi do rozwoju sensytyzacji behawioralnej, która wyrażana jest jako nasilenie działania substancji uzależniającej, podanej po okresie przerwy. U zwierząt, sensytyzacja odzwierciedla zachowania poszukiwawcze (*the drug seeking behaviour*), które u ludzi często prowadzą do nawrotu do nałogu (*the relapse to drug use*) (Robinson and Berridge, 2000). Sensytyzacja behawioralna stanowi ważny parametr oceniający aspekt psychiczny uzależnień lekowych. Eksperymentalnie, sensytyzacja behawioralna najczęściej manifestuje się jako wzrost aktywności lokomotorycznej zwierząt po podaniu dawki wyzwalającej (*challenge dose*) substancji uzależniającej (Guegan i wsp., 2016, Liu i wsp., 2014b), a jej ekspresja związana jest ze wzrostem wydzielania dopaminy w strukturach układu mezo limbicznego (Le Moal i Simon, 1991, Robinson i Berridge, 1993, 2000). Sensytyzacja behawioralna może być także wyrażona jako nasilenie działania nagradzającego substancji uzależniających w teście CPP - sensytyzacja na działanie nagradzające (Manzanedo i wsp., 2005, Sahraei i wsp., 2007, Shippenberg i Heidbreder, 1995) lub, rzadziej, jako wzrost natężenia objawów odstawiennych – sensytyzacja na objawy odstawiennie (Rothwell i wsp., 2010). Wykazano, że w rozwoju sensytyzacji behawioralnej dochodzi do powstawania zmian

adaptacyjnych w strukturach dopaminergicznych i glutaminianergicznych układu mezo limbicznego (Robinson i Berridge, 2008, Vanderschuren i Kalivas, 2000, Vanderschuren i Pierce, 2010, Wolf, 2003). W sensytyzację behawioralną zaangażowane są głównie szlaki dopaminergiczne pochodzące z obszaru brzusznej nakrywki do jądra półleżącego oraz glutaminianergiczne - pochodzące z kory przedczołowej i również docierające do jądra półleżącego. Wykazano, że ekspresja morfinowej sensytyzacji jest związana głównie ze wzrostem wydzielania dopaminy oraz ze zmianą wrażliwości receptorów dopaminergicznych D1 w różnych strukturach układu mezo limbicznego, w tym w prążkowiu, jądrze półleżącym przegrody, obszarze brzusznej nakrywki oraz hipokampie (Kalivas i Duffy, 1987, Reisi i wsp., 2014, Spanagel i Shippenberg, 1993, Spanagel i wsp., 1993, Tjon i wsp., 1994, Tjon i wsp., 1997). U szczurów, farmakologiczne zablokowanie receptorów dopaminergicznych D1 zaburza ekspresję sensytyzacji (Jeziorski i White, 1995). Podobnie, podawanie antagonistów receptorów dopaminergicznych D1 i D2 do jądra półleżącego hamuje rozwój sensytyzacji behawioralnej u szczurów (Reisi i wsp., 2014). Wykazano, że podczas ekspresji morfinowej sensytyzacji, w powłoce jądra półleżącego, tj. w strukturze gdzie obserwowano zwiększoną ekspresję receptorów dopaminergicznych D1, dochodzi do wzrostu aktywności szlaku MAP kinaz (ERK 1/2), a efekt ten hamowany był podaniem antagonisty receptorów D1, SCH 23390 (Borgkvist i wsp., 2008). Z kolei rozwój morfinowej sensytyzacji behawioralnej jest bardziej związany z układem glutaminianergicznym oraz z obszarem brzusznej nakrywki, ponieważ antagoniści receptorów glutaminianergicznych NMDA oraz receptorów dla kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA) hamowali rozwój sensytyzacji u zwierząt (Jeziorski i wsp., 1994; Carlezon i wsp., 1999). Tak więc, podczas ekspresji i akwizycji sensytyzacji behawioralnej w mózgu rozwijają się zmiany adaptacyjne polegające na zmianie gęstości receptorów, wydzielania neurotransmiterów oraz deregulacji przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego.

.....

Uzależnienia od różnych substancji, w tym od substancji opioidowych stanowią globalny, narastający problem medyczny, społeczny i ekonomiczny. Systematycznie wzrasta liczba substancji uzależniających oraz liczba osób uzależnionych, podczas gdy możliwości terapii schorzenia są wciąż ograniczone. W związku z tym, badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów leżących u podłoża uzależnień są uzasadnione. Podejmowane są wielokierunkowe eksperymenty, w których analizuje się czynniki, mogące mieć wpływ na uzależnienia, takie jak: predyspozycje genetyczne, aspekty psychologiczne czy zmiany neurobiologiczne, zachodzące w OUN pod wpływem czynników endo- i egzogennych. Eksperymenty te mogą przyczynić się do opracowania nowych, bardziej skutecznych metod leczenia uzależnień.

#### *Adenozyna jako endogenny czynnik neuromodulujący*

Adenozyna, pod względem chemicznym jest nukleozydem, który składa się z adeniny i rybozy połączonych wiązaniem P-N9-glikozydowym. Wskutek połączenia adenozyny z resztą fosforanową powstają nukleotydy – adenozynotrifosforan (ATP), adenozynodifosforan (ADP), adenozynomonofosforan (AMP) i cykliczny adenozynomonofosforan (cAMP) (Fredholm i wsp., 2001). Jako substancja o właściwościach neuromodulujących, adenozyna włączona jest w szeroki wachlarz działań fizjologicznych. Indukuje działanie nasenne, przeciwłękowe, przeciwdrgawkowe oraz przeciwbólowe (Fredholm i wsp., 2001). Ostatnio coraz częściej podkreślane jest jej działanie neuroprotektcyjne (Ribeiro i wsp., 2016).

Działanie adenozyny związane jest z pobudzeniem receptorów adenozynowych, A1, A2A, A2B i A3. Receptory te należą do grupy receptorów związanych z białkiem G. Już niewielkie stężenie adenozyny wywołuje stymulację receptorów A1 i A2A, podczas gdy pobudzenie receptorów A2B i A3 wymaga znacznie wyższego stężenia endogennego ligandu (Fredholm i wsp., 2001). Różnice w działaniu poszczególnych receptorów zauważalne są także na poziomie przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego. Receptory A1 i A3 sprzężone są z białkiem  $G_i$  i/lub  $G_o$  a ich aktywacja hamuje cyklazę adenylationową, zmniejsza stężenie cAMP i fosfolipazy A oraz hamuje fosforylację białka CREB, hamuje przepływ jonów



wapniowych a zwiększa potasowych (Cunha, 2001, Fredholm i wsp., 2001). Natomiast receptory adenozynowe A2A i A2B są sprzężone z białkiem Gs, a ich pobudzenie indukuje cyklazę adenylanową i prowadzi do wzrostu stężenia cAMP w komórce, aktywacji fosfolipazy A oraz wzrostu fosforylacji białka CREB (Fredholm i wsp., 2001). Rzadziej, w wyniku aktywacji receptorów adenozynowych obserwowany jest wzrost stężenia fosfolipazy C (Abbraccio i wsp., 1995, Ansari i wsp., 2009). Aktywacja receptorów adenozynowych może także pobudzać szlak MAP kinaz w komórce (Charles i wsp., 2003, Mediero i wsp., 2013, Schulte i Fredholm, 2003). Z kolei w badaniach *in vitro* wykazano, że przewlekła aktywacja wszystkich receptorów adenozynowych może prowadzić do ich desensytyzacji poprzez mechanizmy zależne od białka  $\beta$ -arestyny. Wiadomo, że zmiany w poszczególnych receptorach adenozynowych pojawiają się w różnym czasie i nie jest dokładnie wyjaśnione jakie ma to znaczenie dla organizmu żywego (Klaasse i wsp., 2008).

W OUN receptory adenozynowe A1 zlokalizowane są głównie presynaptycznie, równomiernie w różnych strukturach OUN (kora mózgu, mózdzek, hipokamp, rogi grzbietowe rdzenia kręgowego). Natomiast receptory A2A są zlokalizowane pre- i postsynaptycznie w OUN, głównie na zakończeniach GABAergicznym neuronów prążkowiec i gałki bladej (*globus pallidus*) oraz w innych strukturach układu mezolimbicznego (hipokamp, jądro ogoniaste) (Fredholm i wsp., 2001). Pozostałe receptory adenozynowe, A2B oraz A3, zlokalizowane są zarówno w OUN oraz w tkankach obwodowych. Nie stanowiły one przedmiotu opisywanych badań, dlatego nie są tu szczegółowo omawiane.

Adenozyna reguluje wiele ważnych procesów życiowych: a) poprzez wpływ na poziom ATP i ADP, które odgrywają istotną rolę w regulacji procesów energetycznych zachodzących wewnątrz komórek; b) przez bezpośredni wpływ na poziom neuroprzekaźnika II rzędu - cAMP a więc, pośrednio, uczestniczy w przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego; c) pobudzając receptory adenozynowe A1, A2A, A2B i A3, reguluje wydzielanie różnych neuroprzekaźników (Fredholm i wsp., 2001). Już około 30 lat temu wykazano, że pobudzenie receptorów adenozynowych A1 zmniejsza wydzielanie glutaminianu (Corradetti i wsp., 1984), acetylocholino (Sawynok i Jhamandas, 1976), noradrenaliny (Allgaier i wsp., 1987), serotoniny (Feuerstein i wsp., 1988), czy dopaminy (Wood i wsp., 1989), oraz, że w układzie mezolimbicznym, głównie w prążkowiec, pobudzenie receptorów A2A zmniejsza powinowactwo dopaminy do receptorów D2 (Ferré i wsp. 1991). Wyniki te zapoczątkowały kolejne eksperymenty, w których wielokrotnie opisywano interakcje pomiędzy receptorami A1-D1 (Ferré i wsp., 1994b, Ferré i wsp., 1996, Florán i wsp., 2002, Mayfield i wsp., 1999) czy A2A-D2 (Ferré i wsp., 1994a, Mayfield i wsp., 1996) oraz podkreślano potencjalne wykorzystanie ligandów adenozyny w schorzeniach zależnych od dopaminy (uzależnienia lekowe, schizofrenia, choroba Parkinsona) (Lopes i wsp., 2001, Ribeiro i wsp., 2002, Sebastião i Ribeiro, 2009, Sebastião i wsp., 2012). W późniejszych eksperymentach potwierdzono, że adenozyna wchodzi w interakcje z innymi neuroprzekaźnikami, m.in. glutaminianem. Niskie stężenie adenozyny, poprzez wpływ na receptory A1, hamuje wydzielanie glutaminianu i zmniejsza aktywność NMDA receptorów w hipokampie (de Mendonça i wsp., 1995, Klishin i wsp., 1995). Dlatego adenozyna, pośrednio, hamuje zjawisko plastyczności synaptycznej i wykazuje działanie neuroprotektoryjne (Sebastião i wsp., 2001) oraz przeciwdrgawkowe (Li i Henry, 2000). W badaniach *in vitro* oraz *in vivo* potwierdzono, że stymulacja receptorów A2A zlokalizowanych na zakończeniach glutaminianergicznym, kontroluje wydzielanie glutaminianu w prążkowiec, korze mózgu i hipokampie (Ciruela i wsp., 2006, Marchi i wsp., 2002, Popoli i wsp., 1995). Z kolei aktywacja receptorów NMDA w hipokampie obniża wrażliwość neuronów na adenozynę. Działanie to jest prawdopodobnie skutkiem wzmożonej aktywności receptorów presynaptycznych A2A, a nie A1 (Nikhtbakht i Stone, 2001) i może być jednym z mechanizmów osłabienia działania protekcyjnego adenozyny podczas zjawiska ekscytotoksyczności.

Opisano także interakcje pomiędzy receptorami A1 i A2A. Aktywacja A2A receptorów zmniejsza hamujący wpływ agonistów receptorów A1 na przekaźnictwo synaptyczne w hipokampie szczura (Cunha i wsp., 1994, Dixon i wsp., 1997). Efekt ten prawdopodobnie zależy od wzrostu stężenia fosfolipazy C, a nie aktywności cyklazy adenylanowej w neuronach hipokampa (Dixon i wsp., 1997). Może być również

wynikiem wzrostu aktywności transporterów adenozyliny, co obniża stężenie wewnątrzkomórkowe adenozyliny i zmniejsza aktywność receptorów A1 (Pinto-Duarte i wsp., 2005).

Receptory adenozynowe mogą także wchodzić w interakcje z receptorami cholinergicznymi, kanabinoidowymi, z receptorami dla neurotrofin oraz neuropeptydów (Sebastião i Ribeiro, 2009). Nowsze dane literaturowe wskazują, że receptory adenozynowe mogą występować w postaci homo- i heteromerycznej, co może mieć także wpływ na aktywność ligandów (Fredholm i wsp., 2011). Znaczenie kliniczne tego zjawiska nie jest jeszcze w pełni poznane.

#### *Ołów jako egzogeny czynnik neurotoksyczny*

Ołów jest pierwiastkiem powszechnie występującym w środowisku. Nie ma działania fizjologicznego w organizmach żywych, a długotrwała ekspozycja organizmów na ten pierwiastek ma działanie toksyczne (Jakubowski, 2011). Ze względu na rosnącą świadomość szkodliwości ołowiu dla środowiska i zdrowia człowieka, ogranicza się jego zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Działania te dotyczą głównie państw rozwiniętych gospodarczo, ale globalna emisja tego pierwiastka do atmosfery stale kształtuje się na wysokim poziomie (Environmental Protection, Statutory Instruments, 2005). Eksperymentalnie potwierdzono, że u dzieci zamieszkujących tereny o wysokim stopniu urbanizacji, poziom ołowiu we krwi przekraczał dopuszczalne, określone przez Światową Organizację Zdrowia (WHO), normy (10µg/dL krwi) (Rosi, 2008, Barton, 2011).

Na toksyczne działanie ołowiu szczególnie narażone są dzieci. Związane jest to z niedojrzałością bariery jelitowej oraz bariery krew-mózg, a z drugiej strony, z niedostatecznie rozwiniętymi mechanizmami obronnymi (Jakubowski, 2011). Do ekspozycji na ołów może dojść już podczas życia płodowego, gdy metal znajduje się w organizmie matki. Niemowlęta mogą przyjmować ołów z mlekiem matki podczas karmienia naturalnego bądź spożywając inne pokarmy i wodę, w których znajduje się ołów. Ekspozycja na ołów w tym okresie jest szczególnie szkodliwa, ponieważ obejmuje okres intensywnego rozwoju OUN a powstałe w tym czasie zaburzenia są nieodwracalne (Jakubowski, 2011). Wykazano ścisłą korelację pomiędzy podniesionym poziomem ołowiu we krwi u dzieci a zaburzeniami w zachowaniu (agresja, niepokój, lęk, zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD), zmniejszenie koncentracji, zmniejszenie ilorazu inteligencji) (Bellinger i wsp., 1994, Braun i wsp., 2006, Grandjean i Landrigan, 2014, Hu i wsp., 2006, Needleman i Gatsonis CA, 1990). Nowsze doniesienia wskazują, że zaburzenia zachowania u dzieci obserwowano również w grupie dzieci 3-5-letnich, u których średnie stężenie ołowiu wynosiło 6,4 µg/dl, a więc było niższe niż obecnie przyjęte normy (Liu i wsp., 2014). Coraz więcej doniesień wskazuje, że zaburzenia o podłożu neurodegeneracyjnym (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne), obserwowane u osób dorosłych lub w podeszłym wieku, mogą być skutkiem długotrwałej ekspozycji na działanie różnych, neurotoksycznych czynników środowiskowych, w tym ołowiu, w okresie wczesnorozwojowym (Basha i Reddy, 2010, Coon i wsp., 2006, Mendola i wsp., 2002).

Neurotoksyczne właściwości ołowiu wynikają z jego zdolności do zastępowania głównie jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ale też jonów cynku ( $\text{Zn}^{2+}$ ) (Clarkson, 1993) w komórce. Wyniki wielu prac eksperymentalnych wskazują na blokowanie przez jony ołowiu ( $\text{Pb}^{2+}$ ) transportu  $\text{Ca}^{2+}$  w kanałach wapniowych (Audesirk i Audesirk, 1993, Pentyala i wsp., 2010) oraz hamowanie wiązania  $\text{Pb}^{2+}$  do wielu białek wewnątrzkomórkowych zależnych od  $\text{Ca}^{2+}$ . Ma to wpływ na przekaźnictwo wewnątrzkomórkowe, np. kinaz, kalmoduliny, fosfolipaz, kalpainy (Hossain i wsp., 2016, Kern i wsp., 2000, Mazzolini i wsp., 2001, Toscano i wsp., 2005). Wykazano, że ekspozycja na ołów hamuje aktywność kinazy białkowej C (Murakami i wsp., 1993) oraz cykazy adenylanowej i kinazy białkowej A (Sandhir i Gill, 1994) prowadząc w ten sposób m. in. do upośledzenia uwalniania neurotransmiterów. Ołów może się kumulować w uszkodzonych mitochondriach, co sprzyja produkcji wolnych rodników tlenowych (Beal i wsp., 1993). Wpływa także na aktywność MAP kinaz (Cordova i wsp., 2004). Co więcej, neurotoksyczne właściwości ołowiu związane są z aktywnością receptorów glutaminianergicznych NMDA (Marchetti i Gavazzo, 2005), związanych z kanałami wapniowymi. Wykazano, że ołów, moduluje powinowactwo

glicyny do receptora NMDA, hamuje aktywność receptorów NMDA, zaburza ekspresję podjednostek receptora NMDA (NR1/NR2) (Toscano i Guilarte, 2005). Wiadomo, że glutaminian i receptory NMDA odgrywają istotną rolę w regulacji pobudliwości neuronalnej, procesów plastyczności synaptycznej, pamięci i uczenia się (Toscano i Guilarte, 2005). Zatem uszkodzenie receptorów NMDA wywołane długotrwałą ekspozycją na ołów ma bezpośredni, hamujący wpływ na powyższe procesy. W skrajnej sytuacji, wysokie stężenie jonów metali ciężkich w komórce powoduje jej apoptozę (Hossain i wsp., 2016).

W badaniach *in vivo* potwierdzono, że skutkiem długotrwałej ekspozycji na ołów (i związanych z tym wielokierunkowych zaburzeń w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej) są trwałe zmiany adaptacyjne w obrębie neuronów OUN. Obserwowano zwiększenie stężenia acetylocholino i spadek poziomu serotoniny oraz brak wpływu na poziom dopaminy w korze przedczołowej szczurów (Mansouri i wsp., 2013). Wykazano, zależny od dawki ołowiu, wpływ na uwalnianie glutaminianu i GABA w hipokampie (Lasley i Gilbert, 2002). Kała i Jadhav (1995) obserwowali zaburzenia w wydzielaniu dopaminy i serotoniny w różnych strukturach OUN. Leret i wsp. (2002) udokumentowali, że długotrwała ekspozycja na ołów prowadzi do wzrostu wydzielania dopaminy i serotoniny, zmniejsza wydzielanie glutaminianu m.in. w korze mózgu i hipokampie oraz zmniejsza wydzielanie GABA w korze mózgu. Biorąc pod uwagę fakt, że powyższe zaburzenia dotyczą neuroprzekazników, które zaangażowane są w działanie substancji uzależniających, można przypuszczać, że długotrwała ekspozycja na ołów może mieć wpływ na ich aktywność, a zatem, może mieć wpływ na rozwój uzależnień od różnych substancji, w tym morfiny.

### 3.2. Cel naukowy osiągnięcia badawczego

Badania, wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, dotyczą oceny ekspresji zmian fenotypowych u zwierząt doświadczalnych (szczury i myszy) uzależnionych fizycznie oraz psychicznie od morfiny. W eksperymentach, uzależnienie fizyczne badane było na podstawie intensywności morfinowych objawów odstawiennych oraz na podstawie tolerancji na działanie antynocyceptywne morfiny. Uzależnienie psychiczne od morfiny badano w różnych modelach sensytyzacji behawioralnej. W eksperymentach analizowano wpływ mechanizmów endogennych, tj. modulacji układu adenozynowego; oraz czynników egzogennych, tj. długotrwałej ekspozycji na  $Pb^{2+}$ , na fenotyp zwierząt uzależnionych fizycznie oraz psychicznie od morfiny. Zarówno mechanizmy endogenne, jak i egzogenne mogą mieć wpływ na powstawanie i rozwój uzależnienia od morfiny, a poznanie tych zależności może być przydatne w opracowywaniu bardziej skutecznych metod terapii uzależnienia od morfiny oraz innych opioidów.

Zaplanowany i zrealizowany cykl badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego miał na celu:

1. ocenę wpływu endogennego układu adenozynowego w sensytyzacji behawioralnej wywoływanej przerywanym podawaniem morfiny u zwierząt doświadczalnych. W badaniach oceniano:

- wpływ stymulacji receptorów adenozynowych na rozwój nadwrażliwości na morfinę podawaną podczas okresu odstawienia u zwierząt uzależnionych od morfiny (szczury);
- wpływ stymulacji receptorów adenozynowych na rozwój sensytyzacji na aktywność lokomotoryczną wywołaną podawaniem morfiny u myszy;
- wpływ stymulacji i blokowania receptorów adenozynowych na ekspresję i rozwój sensytyzacji na działanie nagradzające morfiny u szczurów;
- wpływ stymulacji receptorów adenozynowych na rozwój sensytyzacji na morfinowe objawy odstawiennie u szczurów;

2. ocenę wpływu czynnika egzogenego (ekspozycja na  $Pb^{2+}$ ) na rozwój uzależnienia fizycznego wywołanego podawaniem morfiny. W badaniach oceniano:

- wpływ prenatalnej i pourodzeniowej ekspozycji na ołów na natężenie morfinowych objawów odstawiennych i rozwój tolerancji na antynocyceptywne działanie morfiny u szczurów dorosłych – znaczenie receptorów dopaminergicznych;
- wpływ prenatalnej i pourodzeniowej ekspozycji na ołów na rozwój tolerancji na antynocyceptywne działanie morfiny u szczurów dorosłych – znaczenie receptorów purynergicznych, adenozynowych oraz aktywacji komórek glejowych.

### 3.3. Opis poszczególnych prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z omówieniem wyników

#### *Wpływ czynników endogennych (układu adenozynowego) na sensytyzację behawioralną wywoływaną przerywanym podawaniem morfiny*

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki zainspirowały mnie do przeprowadzenia kolejnych eksperymentów, mających na celu zbadanie znaczenia układu adenozynowego w powstawaniu uzależnienia od morfiny u zwierząt doświadczalnych. Chociaż wiadome było, że układ adenozynowy ma wpływ na działanie uzależniające morfiny (Kaplan i wsp., 1994), nie było doniesień dotyczących udziału układu adenozynowego w morfinowej sensytyzacji behawioralnej.

W oparciu o dane literaturowe zaplanowałam przeprowadzenie serii eksperymentów, w których oceniałam udział układu adenozynowego w różnych modelach sensytyzacji behawioralnej. Badałam:

- 1) wrażliwość zwierząt uzależnionych od morfiny na podanie jednorazowej dawki morfiny podczas okresu odstawienia w teście aktywności lokomotorycznej;
- 2) sensytyzację na efekty lokomotoryczne morfiny;
- 3) sensytyzację na działanie nagradzające morfiny;
- 4) sensytyzację na morfinowe objawy odstawienne.

**ad. 1.** Pierwsza praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego (**publikacja M1**) dotyczyła eksperymentów, w których w teście ruchliwości (*the locomotor activity test*) badałam wpływ aktywacji układu adenozynowego na reakcję zwierząt wywołaną podaniem jednorazowej dawki morfiny (10 mg/kg) podczas okresu odstawienia morfiny. W tym doświadczeniu, w celu wywołania uzależnienia fizycznego od morfiny myszy otrzymywały wzrastające dawki morfiny 2 razy dziennie przez 5 kolejnych dni (od 10 do 50 mg/kg) oraz 6-go dnia rano (50 mg/kg). Następnie, po 7-miu dniach przerwy, podawana była kolejna dawka morfiny (10 mg/kg) – dawka wyzwalająca (*the challenge dose*). Ruchliwość zwierząt mierzona była w 1-szym i ostatnim dniu doświadczenia, gdy zwierzęta otrzymywały morfinę w dawce 10 mg/kg. Ligandy receptorów adenozynowych: selektywny agonista receptora adenozynowego A1 - *N<sup>6</sup>-cyklopentyladenozyna* (CPA); A2A – *chlorowodorek p-(2-karboksyetylo)fentylamino-5'-N-etylokarboksyamidoadenozyny* (CGS 21680) oraz nieselektywny agonista receptorów A1/A2A - *5'-N-etylokarboksyamidoadenozyna* (NECA) podawane były przed każdą iniekcją morfiny, z wyjątkiem ostatniej dawki, tj. dawki wyzwalającej.

- Wykazałam, że podanie, uzależnionym od morfiny myszom, wyzwalającej dawki morfiny w okresie odstawienia powoduje wzrost aktywności lokomotorycznej zwierząt, co wskazuje na rozwój zachowań sprzyjających nawrotom do nałogu. Ponadto wykazałam, że przewlekła stymulacja obu typów receptorów A1 i A2A lub tylko A2A, ale nie samego A1, podczas chronicznego podawania morfiny, statystycznie istotnie obniżyła ruchliwość badanych zwierząt po podaniu dawki wyzwalającej morfiny. Można zatem wnioskować, że badane ligandy, głównie poprzez pobudzenie receptorów A2A, hamują obserwowaną podczas okresu odstawienia, nadwrażliwość zwierząt uzależnionych od morfiny na jednorazową dawkę morfiny. Uzyskany wynik może mieć istotne znaczenie w hamowaniu zachowań prowadzących do nawrotu do nałogu.

**ad. 2.** W następnych badaniach, (**publikacja M2**), które opublikowane zostały w 2011 roku, określiłam wpływ pobudzenia receptorów adenozytowych na rozwój sensytyzacji na efekty lokomotoryczne morfiny u myszy. W zastosowanym modelu doświadczalnym rozwój sensytyzacji uzyskałam poprzez przerywane podawanie morfiny (5 iniekcji morfiny co 3-ci dzień) w dawce 10 mg/kg, a następnie, po 7-dniowym okresie przerwy, podawałam dawkę wyzwalającą morfiny (10 mg/kg). Bezpośrednio po każdej iniekcji morfiny, w celu skojarzenia iniekcji morfiny z otoczeniem, zwierzęta umieszczane były w klatkach, służących do pomiaru ruchliwości zwierząt.

➤ Wykazałam, że przerywane podawanie morfiny nasilało wzrost ruchliwości myszy obserwowany po podaniu dawki wyzwalającej morfiny, co potwierdziło rozwój sensytyzacji behawioralnej u badanych zwierząt. Podanie wszystkich agonistów receptorów adenozytowych, tj. CPA, CGS 21680 i NECA, przed każdą iniekcją morfiny (z wyjątkiem dawki wyzwalającej), statystycznie istotnie zmniejszyło ruchliwość zwierząt. Wykazałam, że badane substancje mają istotne znaczenie w tłumieniu zachowań poszukiwawczych, tym samym, w hamowaniu reakcji zwierząt, które mogą prowadzić do nawrotu do nałogu.

**ad. 3.** W kolejnych eksperymentach, (**publikacja M3**), przeprowadziłam badania dotyczące interakcji pomiędzy układem adenozytowym a sensytyzacją na działanie nagradzające morfiny, u szczurów. Działanie nagradzające morfiny oceniałam w teście warunkowej preferencji miejsca (*the conditioned place preference test*- CPP). Test CPP (metoda obciążona - *biased*) przeprowadziłam w oparciu o powszechnie wykorzystywaną metodykę (Randall i wsp., 1998, Sadeghi i wsp., 2016) służącą do oceny działania nagradzającego substancji uzależniających, którą zmodyfikowałam w oparciu o metodykę opisaną przez Sahraei i wsp., (2007). Eksperyment podzielony był na fazy: 1. habituacja, 2. warunkowanie, 3. test preferencji miejsca, 4. odstawienie morfiny, 5. test sensytyzacji. Morfina, w dawce 5 mg/kg, podawana była szczurom podczas fazy warunkowania przez 3 kolejne dni, a następnie, w celu skojarzenia iniekcji morfiny z otoczeniem, zwierzę umieszczane było w jednym z pomieszczeń aparatu do testu CPP. Taki schemat podawania morfiny wydłużał czas przebywania zwierząt w pomieszczeniu kojarzonym z podaniem morfiny w czasie testu (faza 3), co świadczy o rozwiniętym działaniu nagradzającym morfiny. Sensytyzację na działanie nagradzające morfiny rozwinięto po 3-ciej fazie testu CPP, odstawiając podawanie morfiny zwierzętom aż do 8-mego dnia doświadczenia (faza 4). Następnie, w dniu testu sensytyzacji (9-ty dzień doświadczenia) szczury otrzymały wyzwalającą dawkę morfiny (wielokrotnie niższą niż podczas warunkowania - 0,75 mg/kg) i ponownie mierzono preferencję miejsca zwierząt.

➤ Wykazałam, że szczury, które otrzymywały wyzwalającą dawkę morfiny po okresie przerwy spędzały znacznie więcej czasu w pomieszczeniu sprzężonym z podaniem morfiny. Zachowanie to potwierdziło rozwój sensytyzacji behawioralnej u zwierząt. Udział układu adenozykowego w sensytyzacji na działanie nagradzające morfiny badałam podając ligandy receptorów adenozytowych (agoniści i antagoniści) w ostatnim dniu doświadczenia (ekspresja sensytyzacji) lub podczas fazy warunkowania (akwizycja sensytyzacji). Oprócz wcześniej wymienionych agonistów receptorów adenozytowych, CPA, CGS 2160 i NECA, w doświadczeniu oceniałam także rolę antagonistów tych receptorów, tj. selektywnego antagonistę receptorów adenozytowych A1 - 8-cyklopentylo-1,3-dipropylksantynę (DPCPX), A2A - 2-(2-furanylo)-7-(2-feniloetylo)-7H-pirazolo(4,3-e)(1,2,4)triazolo(1,5-c)pyrimidin-5-aminę (SCH 58261) oraz nieselektywnego antagonistę receptorów A1 i A2A – kofeinę. W badaniach wykazałam, że w ekspresji sensytyzacji na działanie nagradzające morfiny u szczurów, ważną rolę odgrywają receptory adenozytowe A1, ponieważ agonista tych receptorów, CPA, statystycznie istotnie skracał czas przebywania zwierząt w pomieszczeniu sprzężonym z podaniem morfiny, a więc hamował ekspresję sensytyzacji. Co więcej, antagonistę receptorów A1, DPCPX, wywoływał przeciwny efekt. Interesujące wyniki uzyskałam w badaniu dotyczącym akwizycji sensytyzacji – wszystkie ligandy (agoniści i antagoniści) hamowały rozwój sensytyzacji na działanie nagradzające morfiny u szczurów.

Analizując potencjalne mechanizmy, które mogą być odpowiedzialne za wyniki powyższych badań (**publikacje M1, M2, M3**) należy wziąć pod uwagę rozmieszczenie poszczególnych receptorów adenozynowych w OUN oraz zmiany w ich ekspresji po długotrwałym podawaniu morfiny. Receptory adenozynowe A1 występują w całym mózgu, a ich stymulacja prowadzi do zmniejszenia wydzielania różnych neuroprzekazników w OUN. Natomiast receptory A2A są głównie zlokalizowane na zakończeniach GABAergicznym prążkowie i gałki bladej, a ich stymulacja indukuje interakcje z innymi receptorami, takimi jak dopaminergiczne D2 czy glutaminianergiczne (Sebastião i Ribeiro, 2009). Eksperymentalnie potwierdzono, że przewlekła ekspozycja na morfinę prowadzi do wzrostu ekspresji receptorów A1 w hipokampie (Kaplan i wsp., 1994), wzrostu ilości transporterów adenozynowych (Kaplan i Leite-Morris, 1997) i zwiększenia wrażliwości na adenozynę w jądrze półleżącym (Brundege i Williams, 2002). Natomiast przewlekła ekspozycja na morfinę nie ma wpływu na ekspresję receptorów A2A (Kaplan i wsp., 1994). Można zatem wnioskować, że wywołany przewlekłym podawaniem morfiny wzrost ekspresji receptorów A1 w hipokampie mógł mieć wpływ na uzyskane wyniki doświadczeń, a szczególnie tych, w których wykazano zaangażowanie ligandów receptorów A1. Z kolei, udział receptorów adenozynowych A2A w badanych efektach prawdopodobnie był wynikiem złożonych interakcji pomiędzy receptorami A2A a receptorami dopaminergicznymi i glutaminianergicznymi, które są zaangażowane w sensytyzację behawioralną. Interakcje pomiędzy receptorami adenozynowymi a receptorami dopaminergicznymi oraz glutaminianergicznymi opisywane były wielokrotnie (Fredholm i wsp., 2001, Sebastião i Ribeiro, 2009). Można też przypuszczać, że złożone interakcje między wyżej wymienionymi receptorami odpowiadają za hamowanie rozwoju morfinowej sensytyzacji przez agonistów jak i antagonistów receptorów adenozynowych.

**ad. 4.** Dalsze moje badania, (**publikacja M4**), dotyczyły oceny udziału układu adenozynowego w rozwoju sensytyzacji na objawy odstawienne morfiny u szczurów. Analizując dane literaturowe dotyczące uzależnienia fizycznego od morfiny zauważyłam, że w dużej mierze prezentowane modele badawcze stosują przewlekłą ekspozycję na morfinę. Natomiast u pacjentów uzależnionych od morfiny i innych substancji uzależniających okresy przyjmowania substancji przeplatane są okresami przerw w jej stosowaniu. Spowodowane może to być, np. nieefektywnymi próbami leczenia tych osób lub brakiem możliwości zdobycia substancji uzależniającej. Co więcej, pacjenci którzy podejmowali próby leczenia także sugerowali, że każda kolejna próba rzucenia nałogu jest trudniejsza, a objawy odstawienia substancji uzależniającej są silniejsze od tych, które odczuwane są podczas pierwszej próby (Ward i Stephens, 1998). W celu oceny tych zależności przeprowadziłam badania, w których szczurom podawałam morfinę w dawkach wzrastających (10-50 mg/kg) przez 8 dni, ale zastosowałam trzy 36-godzinne epizody odstawienia morfiny (podawanie przerywane), co dało łącznie 11 dni eksperymentu. Następnego dnia (12 dzień doświadczenia), godzinę po podaniu ostatniej iniekcji morfiny, w celu wywołania objawów odstawiennych, zwierzęta otrzymały iniekcję antagonisty receptorów opioidowych - naloksonu (2 mg/kg), a następnie obserwowane były morfinowe objawy odstawienne (liczba wyskoków).

- Wykazałam, że liczba wyskoków zwierząt była statystycznie istotnie wyższa w grupie zwierząt otrzymujących morfinę w sposób przerywany, w porównaniu do grupy, która otrzymywała morfinę w sposób przewlekły. Uzyskane wyniki potwierdziły założenie, że powtarzane epizody odstawienia morfiny powodują rozwój sensytyzacji na objawy odstawienne.

Udział układu adenozynowego w niniejszej sensytyzacji badałam poprzez podanie 2 iniekcji (w odstępie 12 godzin) selektywnych agonistów receptorów adenozynowych A1 – (CPA) lub A2A (CGS 21680) w każdym z epizodów odstawienia morfiny (łącznie 6 iniekcji). Godzinę po ostatniej iniekcji morfiny podawany był nalokson, a następnie obserwowane były objawy odstawienne.

- W badaniu wykazałam, że podawanie selektywnych agonistów receptorów adenozynowych A1 i A2A hamowało rozwój sensytyzacji na morfinowe objawy odstawienne u szczurów.

Aby poznać mechanizmy, które są odpowiedzialne za zmiany w zachowaniu badanych zwierząt, po badaniach behawioralnych zwierzęta zostały poddane dekapitacji w celu pobrania wybranych struktur

mózgu (prążkowie, hipokamp, kora przedczołowa) do badań neurochemicznych i molekularnych. W badaniach tych oceniane były zmiany w układzie dopaminergicznym. Badania neurochemiczne zostały przeprowadzone we współpracy z Zakładem Neurochemii, Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, natomiast badania molekularne zostały przeprowadzone we współpracy z Pomorskim Uniwersytetem Medycznym w Szczecinie (Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Katedra i Zakład Fizjologii, Zakład Biochemii i Żywienia Człowieka) oraz z Uniwersytetem Przyrodniczym w Lublinie (Katedra Anatomii Patologicznej).

W badaniach neurochemicznych, przy użyciu chromatografii wysokociśnieniowej, oceniano stężenie dopaminy, jej metabolitów pośrednich: kwasu 3,4- dihydroksyfenylooctowego (DOPAC), 3-metoksytyraminy (3-MT); oraz metabolitu końcowego - kwasu homowanilinowego (HVA). Wykazałam, że przerywane podawanie morfiny, prowadzące do rozwoju sensytyzacji na objawy odstawienne, wywołuje istotne różnice w poziomie wydzielanej dopaminy i jej metabolitów w badanych strukturach mózgu.

➤ Wykazałam, że przewlekłe podawanie morfiny nie ma wpływu na poziom dopaminy w hipokampie. Natomiast statystycznie istotny spadek poziomu dopaminy oraz jej metabolitów (DOPAC i HVA, ale nie 3-MT) obserwowałam u szczurów, które otrzymywały morfina w sposób przerywany. Obserwowany w hipokampie wzrost poziomu jednego z metabolitów, 3-MT, był efektem niespecyficznym, gdyż był widoczny zarówno po podaniu przewlekłym, jak i przerywanym morfiny. Zgodnie z danymi literaturowymi, w pewnych warunkach, 3-MT może być pozaneuralnie syntetyzowany przez katecholometylotransferazę na skutek wzmożonego wydzielania dopaminy (Kehr, 1976), co miało miejsce u badanych szczurów podczas podawania morfiny.

➤ Wykazałam, zależne od sposobu podawania morfiny, statystycznie istotne różnice w stężeniu dopaminy w korze przedczołowej u badanych szczurów. Podawanie przewlekłe morfiny zwiększało poziom wydzielanej dopaminy (ale nie metabolitów) i obniżało wskaźnik HVA/DA, co sugeruje osłabienie przemian metabolicznych dopaminy w korze przedczołowej. Natomiast wzrost stężenia dopaminy oraz jej metabolitów obserwowany był po przerywanym podawaniu morfiny. Ponadto wskaźnik HVA/DA był także statystycznie istotnie zwiększony u tych zwierząt, co sugeruje, że pod wpływem przerywanego podawania morfiny w korze przedczołowej nie tylko dochodzi do zwiększenia wydzielania dopaminy, ale też do nasilenia przemian metabolicznych dopaminy.

➤ Wykazałam, że w prążkowie, strukturze mózgu bogatej w neurony dopaminergiczne i ściśle związanej z pojawianiem się objawów odstawienych, u zwierząt otrzymujących morfina przewlekłe, dochodzi do spadku poziomu dopaminy (ale nie jej metabolitów), co potwierdziło wyniki innych autorów (Diaz i wsp., 2003). Statystycznie istotnie zwiększona wartość wskaźnika HVA/DA u tych zwierząt sugeruje wzrost metabolizmu dopaminy. Wykazałam także, że przerywane podawanie morfiny nie miało wpływu na stężenie dopaminy i jej metabolitów oraz wskaźnik HVA/DA w prążkowie.

➤ Wykazałam, że podawanie selektywnych ligandów receptorów adenozynowych w okresach przerw w podawaniu morfiny nie miało wpływu na wydzielanie dopaminy w badanych strukturach mózgu.

Badania molekularne wybranych struktur mózgu polegały na analizie ekspresji mRNA i białka receptorów dopaminergicznych D1 i D2 z wykorzystaniem, odpowiednio, techniki łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) i analizy *Western blot*. Badania wykazały, że ekspresja receptorów dopaminergicznych zmienia się w zależności od schematu podawania morfiny oraz pod wpływem stymulacji receptorów adenozynowych w okresach przerw w podawaniu morfiny.

➤ Wykazałam, że przewlekłe podawanie morfiny nie wpływało na ekspresję receptorów D1 i D2 w hipokampie badanych zwierząt, natomiast przerywane podawanie morfiny indukowało statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA i białka obu receptorów.

➤ Wykazałam, że w korze przedczołowej wzrost ekspresji mRNA i białka receptorów D1 i D2 obserwowany był po przewlekłym, ale nie przerywanym podawaniu morfiny.

- Wykazałam, że w prążkowie, po przewlekłym podawaniu morfiny nastąpił statystycznie istotny spadek mRNA i białka D1, ale nie D2, receptorów; podczas gdy przerywane podawanie morfiny zmniejszało gęstość obu typów receptorów.
- Wykazałam, że podawanie selektywnych agonistów receptorów adenozytowych A1 (CPA) i A2A (CGS 21680) w okresach przerw między podawaniem morfiny zmniejszało ekspresję mRNA i białka receptorów dopaminergicznych D1 i D2 w hipokampie w porównaniu do grupy zwierząt otrzymujących morfinę w sposób przerywany.
- Wykazałam, że w korze przedczołowej podawanie CPA zwiększało, a CGS 21680 hamowało, ekspresję obu receptorów.
- Wykazałam, że podawanie CPA i CGS 21680 nie wpływało na ekspresję receptorów D1 w prążkowie w porównaniu do grupy zwierząt otrzymujących morfinę w sposób przerywany, natomiast podawanie CPA zwiększało, a CGS 21680 – nie miało wpływu, na ekspresję mRNA i białka receptorów dopaminergicznych D2.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można wnioskować, że wielokrotne epizody odstawienia morfiny wpływają na zwiększenie natężenia kolejnych epizodów objawów abstynencyjnych, co, prawdopodobnie, spowodowane jest zmienionym wydzielaniem dopaminy w badanych strukturach mózgu, szczególnie w hipokampie i korze przedczołowej. Prowadzi to do powstawania zmian w ekspresji receptorów dopaminergicznych D1 i D2 w każdej z badanych struktur mózgu. Podawanie selektywnych agonistów receptorów adenozytowych w poszczególnych okresach odstawienia morfiny, ale nie podczas ostatniego epizodu, znacznie zmniejszyło natężenie obserwowanych objawów odstawiennych u szczurów. Wydaje się, że spowodowane było to wpływem związków adenozytowych na ekspresję receptorów dopaminergicznych D1 i D2, ale nie wpływem na wydzielanie dopaminy, w strukturach układu mezokortykolimbicznego. Opisane eksperymenty przedstawiają kompleksową, a zarazem interdyscyplinarną analizę zmian adaptacyjnych zachodzących pod wpływem przerywanego podawania morfiny. Wyniki badań zostały opublikowane w prestiżowym czasopiśmie „Psychopharmacology, 2016”.

.....

Podsumowując, wyniki badań dotyczące udziału układu adenozykowego w różnych aspektach sensytyzacji behawioralnej u zwierząt doświadczalnych są nowatorskie i wskazują na istnienie kompleksowych powiązań pomiędzy układem adenozykowym a opioidowym, zarówno na poziomie behawioralnym, jak i komórkowym. Powiązania, w dużej mierze, zależą od aktywności układu dopaminergicznego. Modułacja układu adenozykowego hamuje nadwrażliwość zwierząt uzależnionych fizycznie od morfiny na wyzwalającą dawkę morfiny, hamuje rozwój sensytyzacji na aktywność lokomotoryczną, moduluje sensytyzację na działanie nagradzające morfiny oraz hamuje sensytyzację na morfinowe objawy odstawiennicze. Uzyskane wyniki sugerują, że związki modulujące układ adenozykowy mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu uzależnienia od opioidów.

*Wpływ czynników egzogennych (ekspozycja na  $Pb^{2+}$ )  
na rozwój uzależnienia fizycznego wywołanego podawaniem morfiny*

Drugą grupę badań włączonych do osiągnięcia naukowego stanowiły eksperymenty behawioralne i molekularne, w których oceniałam wpływ czynników egzogennych (środowiskowych) na rozwój uzależnienia fizycznego od morfiny u szczurów (**publikacje M5 i M6**). Badania te zostały przeprowadzone we współpracy z Pomorskim Uniwersytetem Medycznym w Szczecinie (Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Katedra i Zakład Fizjologii, Zakład Biochemii i Żywienia Człowieka) oraz z Uniwersytetem Przyrodniczym w Lublinie (Katedra Anatomii Patologicznej). Spośród różnych czynników egzogennych, które mogą mieć wpływ na aktywność OUN, wybrałam wpływ prenatalnej i pourodzeniowej ekspozycji na  $Pb^{2+}$ , jako substancję powszechnie występującą w środowisku o udokumentowanym działaniu neurotoksycznym. W doświadczeniach, ekspozycja wywołana była poprzez podawanie szczurom do picia octanu ołowiu (0,1%), zamiast wody. Samice szczurów pocono octanem



ołowiu w okresie od zapłodnienia, poprzez okres ciąży, aż do 21 dnia życia potomstwa. W tym dniu potomstwo odstawiano od matek, a następnie, potomstwo-samce pojonono octanem ołowiu jeszcze przez 7 dni (do 28 dnia życia). Taki schemat ekspozycji na  $Pb^{2+}$  nie tylko naśladował schemat narażenia organizmów na działanie ołowiu w środowisku, ale pozwalał na uzyskanie u potomstwa wartości stężenia  $Pb^{2+}$  we krwi analogicznych do tych, notowanych u dzieci zamieszkujących obszary o wysokim stopniu urbanizacji (Baranowska-Bosiacka i wsp., 2013, Barton, 2011). Prace z wykorzystaniem takiego modelu neurotoksyczności ołowiu były już wcześniej publikowane (Baranowska-Bosiacka i wsp., 2012).

Gdy samce osiągnęły wiek dorosły, tj. 60-ty dzień życia, przeprowadziłam badania behawioralne (**publikacja M5**). Miały one na celu określenie wpływu ekspozycji na ołów na rozwój uzależnienia fizycznego od morfiny u szczurów dorosłych. Zastosowałam dwie procedury eksperymentalne, tj. ocenę natężenia morfinowych objawów odstawiennych oraz ocenę rozwoju tolerancji na przeciwbólowe działanie morfiny. Uzależnienie fizyczne od morfiny u szczurów uzyskano poprzez podawanie morfiny dwa razy dziennie, w dawkach wzrastających (od 10 do 50 mg/kg), przez 5 kolejnych dni. Dnia 6-go rano zwierzęta otrzymały kolejną iniekcję morfiny. Następnie, 1 godzinę później, w celu indukcji morfinowych objawów odstawiennych zwierzęta otrzymywały nalokson (2 mg/kg). U zwierząt rejestrowana była liczba wyskoków (*jumpings*), drżenia łap (*paw tremors*), zgrzytanie zębów (*teeth chattering*) oraz potrząsanie głową (*wet dog shakes*). Eksperymenty, mające na celu ocenę rozwoju tolerancji na antynocyceptywne działanie morfiny polegały na podawaniu morfiny (10 mg/kg) jeden raz dziennie przez 7 kolejnych dni. W pierwszym i ostatnim dniu eksperymentu przeprowadzono test zanurzenia ogona (*the immersion test*), w którym badano czas reakcji zwierząt na bodziec nocyceptywny.

- Wykazałam, że liczba wyskoków zwierząt poddanych działaniu morfiny i ołowiu była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do wyskoków obserwowanych u zwierząt otrzymujących tylko morfinę.
- Wykazałam, że tolerancja na działanie antynocyceptywne morfiny była silniej wyrażona u zwierząt poddanych działaniu morfiny i ołowiu w porównaniu do zwierząt otrzymujących tylko morfinę.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że długotrwała prenatalna i pourodzeniowa ekspozycja na działanie ołowiu nasila rozwój uzależnienia fizycznego od morfiny u szczurów dorosłych. Objawia się to nasileniem natężenia objawów odstawiennych oraz zwiększeniem ekspresji tolerancji na działanie antynocyceptywne morfiny u badanych zwierząt.

Po badaniach behawioralnych zwierzęta poddano dekapitacji w celu pobrania struktur mózgu (prążkowie, hipokamp i kora przedczołowa) do badań molekularnych. W doświadczeniach (**publikacja M5**) zbadano ekspresję mRNA i białka receptorów dopaminergicznych D2, przy użyciu wspomnianych wcześniej metod: *RT-PCR* i analizy *Western blot*. Przeprowadzono również immunohistochemiczną analizę receptorów D2 w hipokampie.

- Wykazałam, że u zwierząt z rozwiniętymi objawami abstynencji morfinowej, statystycznie istotne zmiany występują w korze przedczołowej: już sama ekspozycja grupy kontrolnej na ołów zwiększała ekspresję mRNA i białka receptorów dopaminergicznych D2. Efekt ten był utrzymany w grupie zwierząt poddanych działaniu morfiny i ołowiu. Podawanie samej morfiny nie zmieniało ekspresji mRNA i białka receptorów dopaminergicznych D2 w korze przedczołowej.
- Wykazałam, że u zwierząt narażonych na działanie ołowiu i/lub morfiny była tendencja do wzrostu ekspresji receptorów D2 w hipokampie, ale, prawdopodobnie ze względu na duże wartości odchylenia standardowego, wyniki nie były statystycznie istotne.
- Wykazałam, że długotrwała ekspozycja na ołów i/lub morfinę nie ma wpływu na ekspresję mRNA i białka receptorów dopaminergicznych D2 w prążkowie.
- Wykazałam, że u szczurów z rozwiniętą morfinową tolerancją na antynocyceptywne działanie morfiny, statystycznie istotne zmiany pod wpływem ołowiu obserwowano w hipokampie. Ekspozycja grupy kontrolnej na ołów zwiększała ekspresję mRNA i białka receptorów dopaminergicznych D2.

Efekt ten był utrzymany w grupie zwierząt poddanych działaniu morfiny i ołowiu. Podawanie morfiny nie miało wpływu na ekspresję mRNA i białka receptorów dopaminergicznych D2 w hipokampie.

➤ Wykazałam, że długotrwała ekspozycja na ołów i/lub morfinę (model tolerancji) nie ma wpływu na ekspresję mRNA i białka receptorów dopaminergicznych D2 w prążkowie i korze przedczołowej.

➤ Analiza immunohistochemiczna receptorów D2 hipokampa w obu modelach eksperymentalnych nie wykazała różnic w rozmieszczeniu receptorów dopaminergicznych D2 w komórce u zwierząt kontrolnych oraz tych, które poddane były działaniu ołowiu. Receptory te zlokalizowane były głównie w obrębie błony komórkowej i cytoplazmy. Pod wpływem przewlekłego podawania samej morfiny receptory D2 uległy przemieszczaniu z cytoplazmy do wnętrza jądra komórkowego (internalizacja). Można wnioskować, że zjawisko to może stanowić jeden z ważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój uzależnienia fizycznego, w tym morfinowej tolerancji. U zwierząt poddanych działaniu ołowiu i morfiny nie obserwowano translokacji receptorów dopaminergicznych, co również może tłumaczyć nasilenie uzależnienia fizycznego od morfiny u badanych zwierząt.

Kolejna praca, (**publikacja M6**), stanowi kontynuację badań i dotyczy analizy zależności pomiędzy długotrwałą ekspozycją na ołów a rozwojem morfinowej tolerancji. Zostały tu przedstawione wyniki badań molekularnych w obrębie prążkowie, hipokampa oraz kory przedczołowej, w których oceniana była ekspresja mRNA i białka receptorów purynergicznych P2X4 i P2X7 i adenozynowych A1 oraz ekspresja mRNA markerów komórek mikroglejowych, tj. zjonizowanej, adaptorowej cząsteczki wiążącej wapń, typu 1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1* - Iba1) i astrocytów, tj. kwaśne białko włókienkowe (*glial fibrillary acidic protein* – GFAP).

Obserwowano zmiany w ekspresji mRNA i białka receptorów purynergicznych:

➤ Wykazałam, że długotrwała ekspozycja szczurów na ołów wywołuje statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA i białka receptorów purynergicznych P2X4 w prążkowie i korze przedczołowej, w porównaniu do grupy kontrolnej (w hipokampie widoczna była tendencja do zwiększonej ekspresji tych receptorów, ale ze względu na duże wartości odchylenia standardowego nie wykazaliśmy statystycznie istotnych różnic). Nie obserwovałam statystycznie istotnych różnic w ekspresji mRNA i białka receptorów P2X4 u zwierząt poddanych działaniu samej morfiny (w hipokampie widoczne były tendencje do zwiększenia wzrostu ekspresji mRNA i białka receptorów P2X4, ale ze względu na wysokie wartości odchylenia standardowego uzyskane różnice nie były statystycznie istotne). U zwierząt poddanych działaniu zarówno ołowiu jak i morfiny ekspresja mRNA i białka receptorów P2X4 utrzymywała się na poziomie podobnym do tego, który obserwowany był u zwierząt otrzymujących  $Pb^{2+}$ .

➤ Wykazałam wzrost ekspresji mRNA i białka receptorów purynergicznych P2X7 u szczurów poddanych działaniu ołowiu w prążkowie i hipokampie, ale nie w korze przedczołowej. Przewlekłe podawanie morfiny szczurom zwiększyło ekspresję mRNA, ale nie białka receptorów P2X7 w hipokampie. U szczurów poddanych działaniu ołowiu i morfiny ekspresja mRNA i białka receptorów P2X7 była, podobnie jak u zwierząt poddanych działaniu samego ołowiu, statystycznie istotnie zwiększona w prążkowie i hipokampie, ale nie w korze przedczołowej.

Wzrost ekspresji receptorów purynergicznych u zwierząt poddanych długotrwałej ekspozycji na ołów oraz otrzymujących morfinę miał charakter bardziej złożony. Receptory purynergiczne P2X są receptorami jonotropowymi, które położone są presynaptycznie i postsynaptycznie w całym obszarze OUN (Burnstock, 2016). Kanały receptorów otwierają się po przyłączeniu endogennego neuroprzekaznika – ATP, którego stężenie może się zwiększać pod wpływem różnych czynników, na przykład w stanach patologicznych (niedotlenienie, udar, podawanie morfiny), a także pod wpływem długotrwałej ekspozycji na  $Pb^{2+}$  (Baranowska-Bosiacka i wsp., 2011a,b). Wówczas, zwiększone wydzielanie ATP prowadzi do wzrostu wydzielania glutaminianu, dalszego wydzielania ATP (Duan i wsp., 2003, Liu i wsp., 2006, Suadacani i wsp. 2006) oraz do aktywacji receptorów purynergicznych -

P2X4 i P2X7, a w konsekwencji, do rozwoju stanu neurozapalnego (*neuroinflammation*) w OUN (Burnstock, 2016). Można przypuszczać, że obserwowany wzrost ekspresji receptorów P2X4 i P2X7 w wybranych strukturach mózgu, u zwierząt poddanych działaniu ołowiu i morfiny wynika z powstawania stanu neurozapalnego, indukowanego długotrwałą ekspozycją na ołów. Można również wnioskować, że może mieć to wpływ na nasilenie fizycznych objawów uzależnienia od morfiny u badanych zwierząt.

Analizowałam także zmiany w ekspresji mRNA i białek receptorów adenozynowych A1 u zwierząt w teście tolerancji na morfinę, poddanych w okresie prenatalnym i pourodzeniowym ekspozycji na ołów.

➤ Wykazałam, że ekspozycja grupy kontrolnej na ołów statystycznie istotnie zwiększała ekspresję mRNA i białka A1 receptorów w każdej z badanych struktur mózgu.

➤ Wykazałam, że u szczurów, poddanych działaniu tylko morfiny (test tolerancji) statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA i białka receptorów A1 obserwowany był w prążkowie i hipokampie, ale nie w korze przedczołowej. W hipokampie ekspresja receptorów A1 po podaniu morfiny była znacznie wyższa niż ta, która była obserwowana w innych grupach zwierząt (np. u zwierząt poddanych działaniu ołowiu), co nie jest zaskakujące. Wzrost ekspresji A1 receptorów był już wcześniej opisany jako jeden z mechanizmów adaptacyjnych OUN zachodzących po przewlekłym podawaniu morfiny (Ahlijanian i Takemori, 1986, Kaplan i wsp., 1994). Obecnie coraz więcej doniesień literaturowych podkreśla właściwości neuroprotektoryjne adenozyne (Lopes i wsp., 2011). Można przypuszczać, że wywołany morfina wzrost ekspresji receptorów A1 w hipokampie jest odpowiedzialny za właściwości neuroprotektoryjne adenozyne wobec komórek hipokampa. Jest interesujące, że u zwierząt poddanych działaniu ołowiu i morfiny, ekspresja receptorów A1 była porównywalna z poziomem osiągniętym u zwierząt narażonych tylko na działanie ołowiu. Można zatem wnioskować, że długotrwała ekspozycja zwierząt na ołów osłabia neuroprotektoryjne właściwości adenozyne. Mechanizm ten mógł mieć wpływ na wyniki badań behawioralnych.

Analizowałam także ekspresję mRNA markera komórek mikroglejowych - Iba1 oraz markera astrocytów – GFAP.

➤ Wykazałam, że ekspozycja szczurów kontrolnych na ołów powodowała statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA Iba1 w każdej badanej strukturze mózgu. U szczurów, z rozwiniętą tolerancją na działanie morfiny obserwowano statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA Iba-1 w hipokampie, ale nie w prążkowie czy korze przedczołowej (wyniki były na granicy istotności statystycznej). U szczurów poddanych działaniu ołowiu i morfiny ekspresja mRNA Iba-1 była statystycznie istotnie zwiększona w prążkowie, podczas gdy w hipokampie i korze przedczołowej uzyskane wyniki były na granicy istotności statystycznej.

➤ Wykazałam wzrost ekspresji mRNA GFAP w prążkowie i korze przedczołowej u zwierząt kontrolnych narażonych na ołów (analiza hipokampa wykazała wyniki na granicy istotności statystycznej). Przewlekłe podawanie samej morfiny nie wywołało zmian w ekspresji mRNA GFAP w badanych strukturach (w hipokampie obserwowano tendencje do wzrostu ekspresji mRNA GFAP, ale ze względu na duże wartości odchylenia standardowego nie wykazaliśmy statystycznie istotnych różnic). U szczurów poddanych działaniu ołowiu i morfiny ekspresja mRNA GFAP była, podobnie jak u zwierząt poddanych działaniu samego ołowiu, statystycznie istotnie zwiększona w prążkowie i korze przedczołowej, ale nie w hipokampie (w hipokampie ze względu na duże wartości odchylenia standardowego nie wykazaliśmy statystycznie istotnych różnic).

Wzrost ekspresji mRNA Iba1 i GFAP w badanych strukturach układu mezo-kortykolimbicznego po długotrwałej ekspozycji szczurów na ołów jest zgodny z wynikami innych autorów (Strużyńska i wsp., 2007). Ołów jest substancją neurotoksyczną, która może się kumulować w astrocytach (Holtzman i wsp., 1984). Badania potwierdzają, że w różnych stanach patologicznych, także wskutek długotrwałej ekspozycji na ołów, dochodzi do zwiększonej ekspresji astrocytów i mikrogleju, co prowadzi do wzrostu wydzielania cytokin prozapalnych (Strużyńska i wsp., 2007). Długotrwała aktywacja komórek glejowych

może mieć wpływ na rozwój stanu neurozapalnego w mózgu (González i wsp., 2014), może prowadzić do dysfunkcji OUN (González i wsp., 2014) zmieniając aktywność różnych neuroprzekaźników i neuromodulatorów (Gallo i wsp., 2000, Parpura i wsp., 2012). Można wnioskować, że w naszych doświadczeniach, wzrost ekspresji komórek glejowych i astrocytarnych, stanowi kolejny dowód na to, że pod wpływem długotrwałej ekspozycji zwierząt na ołów w mózgu rozwija się stan neurozapalny, który może mieć wpływ na funkcjonowanie OUN oraz na działanie innych substancji, w tym substancji uzależniających (Miguel-Hidalgo, 2009, Song i Zhao, 2001).

.....

Podsumowując w eksperymentach (**publikacje M5 i M6**) wykazałam, że:

1. Długotrwała (prenatalna i pourodzeniowa) ekspozycja zwierząt na ołów prowadzi do nasilenia fizycznych objawów uzależnienia u szczurów dorosłych. Spowodowane jest to wielokierunkową deregulacją procesów zachodzących w mózgu pod wpływem neurotoksycznych właściwości ołowiu.
2. Pod wpływem ołowiu dochodzi do zaburzeń w układzie dopaminergicznym, którego rola w powstawaniu uzależnienia jest niezaprzeczalna.
3. Pod wpływem ołowiu dochodzi do powstawania stanu neurozapalnego w OUN, który, w niniejszych eksperymentach, udokumentowany był dwukrotnie: na poziomie komórek glejowych oraz receptorów purynergicznych.
4. Pod wpływem ołowiu, dochodzi do osłabienia neuroprotektoryjnych właściwości adenozyliny w hipokampie.

Liczne publikacje wskazują na ważną rolę stanu neurozapalnego w powstawaniu zmian patologicznych w OUN (Gallo i wsp., 2000, Parpura i wsp., 2012). Wykazano rozwój neurozapalenia wskutek długotrwałego przyjmowania substancji uzależniających, np. kokainy czy amfetaminy (Song i Zhao, 2001). Natomiast stan neurozapalny po długotrwałym podawaniu morfiny nie został udokumentowany, ale jest przedmiotem dyskusji (Evans i Cahill, 2016). Dane dotyczące tego zagadnienia oparte są głównie na badaniach *in vitro* (Eidson i wsp., 2017) a ich wyniki są dość zróżnicowane. Obserwowany w naszych badaniach wzrost ekspresji receptorów purynergicznych P2X4, P2X7 oraz markerów komórek mikroglejowych (Iba-1) i astrocytarnych (GFAP) pod wpływem samej morfiny wskazuje na tendencje rozwoju neurozapalenia. Jednakże, potwierdzenie tej hipotezy wymaga dalszych badań.

### 3.4. Wnioski z przeprowadzonych badań

**I. Wyniki badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wykazały, że układ adenozynowy odgrywa istotną rolę w różnych aspektach sensytyzacji behawioralnej, gdyż:**

- 1) Stymulacja receptorów adenozynowych A1 i A2A, lub tylko A2A, wpływa hamująco na powstawanie nadwrażliwości jednorazową dawkę morfiny w teście aktywności lokomotorycznej u zwierząt uzależnionych od morfiny (**publikacja M1**) oraz stymulacja A1 i/lub A2A receptorów hamuje rozwój sensytyzacji na aktywność lokomotoryczną (**publikacja M2**). Dane te sugerują, że pobudzenie receptorów A1 i/lub A2A może mieć hamujący wpływ na rozwój zachowań poszukiwawczych u badanych zwierząt;
- 2) Pobudzenie receptorów A1 hamuje, a ich blokada nasila ekspresję sensytyzacji na działanie nagradzające morfiny u szczurów (**publikacja M3**). Badania te sugerują, że przede wszystkim receptory adenozynowe A1 mają wpływ na ekspresję sensytyzacji na działanie nagradzające morfiny.
- 3) W akwizycji sensytyzacji na działanie nagradzające morfiny zarówno stymulacja receptorów A1 i/lub A2A oraz ich blokada zmniejsza rozwój sensytyzacji. Potwierdza to, że układ adenozynowy ma hamujący wpływ na rozwój działania nagradzającego morfiny podawanej po okresie przerwy w jej przyjmowaniu (**publikacja M3**);

4) Stymulacja receptorów adenozynowych A1 lub A2A zmniejsza rozwój sensytyzacji na objawy odstawienniczej morfiny u szczurów. Dane te sugerują, że agoniści receptorów adenozynowych mogą działać hamująco na powstawanie objawów odstawienniczych podczas wielokrotnie podejmowanych prób leczenia nałogu u pacjentów uzależnionych od opioidów (**publikacja M4**);

Ponadto udokumentowano, że:

a) w wyniku wielokrotnego odstawiania morfiny dochodzi do zwiększenia natężenia objawów odstawienniczych podczas kolejnych epizodów odstawienia morfiny (**publikacja M4**);

b) powtarzane epizody odstawienia morfiny prowadzą do dysfunkcji układu dopaminowego, polegającej na zmianie wydzielania dopaminy i jej metabolitów oraz na zmianie w ekspresji receptorów dopaminowych D1 i D2 w wybranych strukturach układu mezokortykolimbicznego. Może mieć to wpływ na wzrost ekspresji morfinowych objawów odstawienniczych (**publikacja M4**);

c) hamujący wpływ ligandów receptorów adenozynowych A1 i A2A na rozwój sensytyzacji na objawy odstawienniczej morfiny jest skutkiem zmian adaptacyjnych w obrębie receptorów dopaminergicznich, ale nie ma wpływu na wydzielanie dopaminy podczas kolejnych epizodów odstawienia morfiny (**publikacja M4**);

**II. Wyniki badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wykazały, że czynniki środowiskowe mają wpływ na uzależnienie fizyczne od morfiny, gdyż:**

1) długotrwała (prenatalna i pourodzeniowa) ekspozycja na  $Pb^{2+}$  prowadzi do nasilenia uzależnienia fizycznego od morfiny. Objawia się to jako nasilenie ekspresji morfinowych objawów odstawienniczych oraz nasilenie rozwoju tolerancji na działanie antynocycetywne morfiny (**publikacja M5**);

2) prenatalna i pourodzeniowa ekspozycja na  $Pb^{2+}$  powoduje zmiany w ekspresji receptorów dopaminergicznich (D2), purynergicznich (P2X4, P2X7) i adenozynowych (A1) w wybranych strukturach układu mezokortykolimbicznego, które są odpowiedzialne za wzrost ekspresji fizycznych objawów uzależnienia od morfiny (objawy odstawiennicze i tolerancja na działanie przeciwbólowe)- (**publikacja M5 i M6**);

3) prenatalna i pourodzeniowa ekspozycja na  $Pb^{2+}$  zwiększa ekspresję markerów komórek mikroglejowych i astrocytarnych w wybranych strukturach układu mezokortykolimbicznego, co sugeruje powstawanie stanu neurozapalnego. Można przypuszczać, że pod wpływem ekspozycji na  $Pb^{2+}$ , w układzie mezolimbicznym rozwija się stan neurozapalny, co może mieć wpływ na silniejszy rozwój uzależnienia od morfiny (**publikacja M6**);

4) Moje badania sugerują, że długotrwała ekspozycja na morfinę może prowadzić do rozwoju stanu neurozapalnego w strukturach układu mezokortykolimbicznego, chociaż uzyskane wyniki wymagają dalszych badań (**publikacja M6**).

**Podsumowując, w pracach włączonych do osiągnięcia naukowego wykazałam, że zarówno czynniki endogenne (układ adenozynowy), jak i egzogenne (prenatalna i pourodzeniowa ekspozycja na  $Pb^{2+}$ ) mają wpływ na ekspresję zmian fenotypowych u zwierząt uzależnionych od morfiny. Uzyskane wyniki badań potwierdzają złożony mechanizm powstawania uzależnień.**

### 3.5. Wykorzystanie wyników prac

Uzależnienia lekowe stanowią problem globalny, zarówno medyczny jak i społeczny oraz ekonomiczny. Na całym świecie, mimo intensywnych badań, notowany jest wzrost liczby osób przyjmujących różne

substancje o potencjale uzależniającym. Stale rośnie liczba nowych substancji nadużywanych, także tych oddziałujących na receptory opioidowe. Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego były zaprojektowane z myślą o ich potencjalnym, praktycznym wykorzystaniu, mającym na celu ograniczenie szeroko rozumianej problematyki uzależnień.

- Hamujący wpływ ligandów receptorów adenozytowych, wykazany w różnych modelach sensytyzacji behawioralnej u zwierząt doświadczalnych, może przyczynić się do opracowania nowej strategii leczenia pacjentów uzależnionych od morfiny oraz innych substancji opioidowych. Związki oddziałujące na układ adenozytowy tłumiliby zachowania poszukiwawcze substancji uzależniającej oraz zmniejszałyby działanie nagradzające kolejnej dawki opioidu, co mogłoby być wykorzystane w leczeniu nawrotu do nałogu.
- Wykazanie, że prenatalna i pourodzeniowa ekspozycja zwierząt na ołów nasila objawy fizycznego uzależnienia od morfiny wskutek receptorowych zmian adaptacyjnych oraz wzmożonej aktywności komórek glejowych w układzie mezolimbicznym, może przyczynić się do opracowania nowych metod profilaktyki i zwalczania uzależnień.
- Wyniki badań uświadamiają spektakularny wpływ środowiska (zawartość metali ciężkich) na intensywność uzależnień od morfiny i innych substancji.
- Uzyskane wyniki mogą stanowić również inspirację do dalszych badań nad mechanizmem uzależnień od różnych substancji.

#### **4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych:**

##### **4.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych oraz wynikające z realizacji pracy doktorskiej**

Pracę naukową rozpoczęłam jako studentka V roku Studiów Farmaceutycznych, wykonując eksperymenty w ramach realizacji pracy magisterskiej w Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką Akademii Medycznej w Lublinie. Podczas wykonywania doświadczeń opisanych w pracy magisterskiej, zatytułowanej „Wpływ ligandów receptorów adenozytowych na morfinową preferencję miejsca u szczurów” poznałam podstawowe zasady wykonywania badań behawioralnych, pogłębiłam wiedzę w zakresie neurobiologii uzależnień, właściwości farmakologicznych adenozyminy oraz poznałam różne aspekty pracy naukowej.

W październiku 2000 roku podjęłam pracę na etacie naukowo-dydaktycznym w Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką, gdzie zostałam włączona do zespołu badawczego, kierowanego przez prof. dr hab. Sylwię Fidecką. Początkowo kontynuowałam badania dotyczące wpływu ligandów receptorów adenozytowych na działanie nagradzające morfiny, a wyniki moich eksperymentów zostały opublikowane w 2002 roku (zał. 4, pkt. II D, poz. 1). Wykazałam wówczas, że receptory adenozytowe A1 i A2A uczestniczą w hamowaniu ekspresji i akwizycji morfinowej preferencji miejsca u szczurów w teście CPP.

Kolejne eksperymenty związane były z realizacją pracy doktorskiej. Dotyczyły one udziału układu adenozyminowego w uzależniającym działaniu substancji uzależniających, należących do grupy benzodiazepin. Są one powszechnie wykorzystywane w leczeniu jako środki nasenne i przeciwlękowe. U myszy, diazepamowe i temazepamowe objawy odstawiennicze indukowane były podaniem progowej dawki pentetrazolu, substancji o działaniu drgawkotwórczym, oraz flumazenilu, antagonisty receptorów benzodiazepinowych, i obserwowane były pod postacią drgawek klonicznych, tonicznych oraz incydentów śmierci. Wykazałam wówczas, że podawanie agonistów receptorów adenozyminowych hamuje ostrość diazepamowych i temazepamowych objawów odstawienniczych, a podawanie antagonistów receptorów adenozyminowych wywołuje działanie przeciwne. Wyniki tych badań zostały opublikowane w 2005 i 2006 roku (zał. 4, pkt. II A, poz. 1; 2). Pozostałe wyniki badań wchodzących w skład pracy doktorskiej zostały opublikowane po jej obronie. W 2008 roku opublikowałam badania, w których

wykazałam hamujący wpływ agonistów receptorów adenozynowych na rozwój sensytyzacji na diazepamowe objawy odstawienne u myszy (załącznik 4, pkt. II A, poz. 3). W 2010 roku opublikowałam badania, w których wykazałam, że agoniści receptorów adenozynowych hamują, a antagoniści receptorów adenozynowych nasilają rozwój tolerancji na zaburzenie koordynacji ruchowej myszy wywołanej długotrwałym podawaniem diazepamu (załącznik 4, pkt. II A, poz. 6).

**Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych obejmuje:**

1. Trzy oryginalne prace o łącznym współczynniku IF = 3,699, KBN/MNiSW = 30 pkt;
2. Cztery prezentacje wyników podczas międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych:
  - Udział w międzynarodowej konferencji Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego, 2004 – prezentacja ustna;
  - Udział w krajowej konferencji (XII<sup>th</sup> Days of Neuropsychopharmacology, 2003) – prezentacja ustna;
  - Udział w konferencji międzynarodowej, 2004 – prezentacja posterowa;
  - Udział w konferencji krajowej, 2005 – prezentacja posterowa;

**4.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze  
po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych**

Moja działalność naukowo-badawcza prowadzona po obronie pracy doktorskiej jest szeroka i dotyczy następujących zagadnień:

- oceny udziału szlaku tlenu azotu (NO): cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) w zaburzeniach pamięci wywołanych podaniem benzodiazepin;
- oceny udziału szlaku NO: cGMP w uzależniającym działaniu benzodiazepin;
- roli układu glutaminianergicznego w uzależniającym działaniu benzodiazepin;
- oceny wpływu nanocząstek srebra na aktywność OUN;
- oceny aktywności przeciwbólowej nowo zsyntetyzowanych substancji;
- jestem autorem prac poglądowych i popularno-naukowych oraz rozdziału w podręczniku.

*Ocena udziału szlaku tlenu azotu (NO): cyklicznego  
guanozynomonofosforanu (cGMP) w zaburzeniach pamięci  
wywołanych podaniem benzodiazepin*

Benzodiazepiny, agoniści receptorów GABAergicznym, od lat stanowią ważną grupę leków, wykorzystywanych w leczeniu jako środki uspokajające, nasenne, przeciwłękowe i przeciwdrgawkowe. Jednym z ważniejszych działań niepożądanych benzodiazepin, obserwowanych zwłaszcza u pacjentów w podeszłym wieku, są zaburzenia pamięci. Mechanizm tych zaburzeń nie jest w pełni wyjaśniony, ale prawdopodobnie związany jest z podjednostką  $\alpha$  receptora GABAergicznego, znajdującego się w hipokampie i korze mózgu (Mohler, 2002). Istnieją dane literaturowe, sugerujące istnienie powiązań pomiędzy receptorami GABAergicznymi a szlakiem NO: cGMP. Na przykład pobudzenie receptorów GABAergicznym powoduje uwalnianie NO, wzrost ilości mRNA kodującego syntazę NO (Li i wsp., 2004), a z drugiej strony, NO kontroluje wydzielanie GABA oraz moduluje aktywność receptorów GABAergicznym (Zanelli i wsp., 2009). Co więcej, eksperymentalnie udokumentowano udział szlaku NO: cGMP w powstawaniu zaburzeń poznawczych oraz zaburzeń pamięci (Gourgiotis i wsp., 2012).

Celem naszych badań była ocena stopnia zaangażowania szlaku NO: cGMP w efekty amnestyczne wybranych benzodiazepin – diazepamu i flunitrazepamu u zwierząt doświadczalnych (myszy i szczury). Do badania procesów uczenia się i pamięci użyto dwóch testów: zmodyfikowanego testu podniesionego labiryntu krzyżowego (*the modified elevated plus maze test* - mEPM) oraz testu rozpoznawania nowego przedmiotu (*the novel object recognition test* - NOR). W celu określenia udziału szlaku NO: cGMP w działaniu amnestycznym benzodiazepin stosowano następujące modulatory: L-argininę, endogenne

prekursor tlenu azotu; ester metylowy N<sup>G</sup>-nitro-L-argininy (L-NAME), nieselektywny inhibitor syntazy tlenu azotu; oraz 7-nitroindazol, selektywny inhibitor neuronalnej syntazy tlenu azotu.

- Wykazano, że związki zmniejszające aktywność szlaku NO: cGMP tj. L-NAME i 7-nitroindazol, nasilają działanie amnestyczne diazepam, u myszy w teście mEPM oraz wywołują działanie amnestyczne diazepam u szczurów w teście NOR po łącznym podaniu z progową dawką diazepam.
- Wykazano, że związki zmniejszające aktywność szlaku NO: cGMP tj. L-NAME i 7-nitroindazol, hamują działanie amnestyczne flunitrazepam, zarówno u myszy w teście mEPM, jak i u szczurów w teście NOR. Natomiast, L-arginina hamuje działanie amnestyczne diazepam u szczurów w teście NOR a nie wpływa na amnestyczne działanie flunitrazepam.

Podsumowując, uzyskane wyniki badań świadczą o znacznym zaangażowaniu szlaku NO: cGMP w działanie amnestyczne benzodiazepin. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopismach o międzynarodowym zasięgu (zał. 4, pkt. II A, poz. 9; 12; 14).

*Ocena udziału szlaku NO: cGMP  
w uzależniającym działaniu benzodiazepin*

Wiadomo, że długotrwałe podawanie benzodiazepin prowadzi do rozwoju tolerancji i uzależnienia fizycznego. Zjawisko to, w dużej mierze, wynika z zaburzenia równowagi pomiędzy receptorami GABAergicznymi i glutaminianergicznymi (Stephens, 1995). Można przypuszczać, że związki modulujące aktywność szlaku NO: cGMP mogą mieć wpływ na powstawanie uzależnienia fizycznego od benzodiazepin.

Celem naszych doświadczeń była ocena udziału szlaku NO: cGMP w rozwoju i ekspresji tolerancji na działanie sedatywne i zaburzenia koordynacji ruchowej wywołane podaniem benzodiazepin, takich jak diazepam i flunitrazepam. Tolerancja na działanie sedatywne benzodiazepin oceniana była w teście aktywności lokomotorycznej, natomiast tolerancję na zaburzenia koordynacji ruchowej zwierząt oceniano w testach pręta obrotowego (*the rota-rod test*) i komina (*the chimney test*). W doświadczeniach stosowano wcześniej wspomniane modulatory szlaku NO: cGMP: L-argininę, L-NAME oraz - N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG) - nieselektywny inhibitor syntazy NO, 7-nitroindazol, sildenafil - selektywny inhibitor fosfodiesterazy 5.

- Wykazano, że przewlekłe podawanie diazepam (5 mg/kg przez 10 dni) prowadziło do rozwoju tolerancji na zaburzenia koordynacji ruchowej, zarówno w teście pręta obrotowego i komina.
- Wykazano, że przewlekłe podawanie zarówno nieselektywnych inhibitorów syntazy NO, L-NAME i L-NOARG, jak i selektywnego inhibitora neuronalnej syntazy NO, 7-nitroindazolu, łącznie z diazepamem zapobiegało rozwojowi tej tolerancji. Obserwowano również nasilenie rozwoju tolerancji podczas łącznego podania L-argininy (endogennego prekursora NO) i diazepam, w teście pręta obrotowego.
- Wykazano, że jednorazowe podanie L-NAME, L-NOARG oraz 7-nitroindazolu hamowało ekspresję tolerancji na zaburzenia koordynacji ruchowej po przewlekłym podawaniu diazepam. Jednorazowe podanie L-argininy nie wpływało na ekspresję tolerancji w badanych testach.
- Wykazano, że przewlekłe podawanie sildenafilu, inhibitora fosfodiesterazy 5, nasilało rozwój tolerancji na działanie zaburzające koordynację, natomiast nie wpływało na rozwój tolerancji na działanie sedatywne diazepam. Wykazano również, iż jednorazowe podawanie sildenafilu nie wpływało na ekspresję tolerancji na badane efekty diazepam. Uzyskane wyniki sugerują, że blokada fosfodiesterazy 5 i związany z tym wzrost stężenia cGMP w komórce, przynajmniej częściowo, wpływa na rozwój tolerancji na działanie diazepam.
- Wykazano, że przewlekłe podawanie flunitrazepam, powoduje rozwój tolerancji na działanie zaburzające koordynację ruchową u myszy, ale nie na działanie sedatywne. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje, iż tolerancja na różne działania benzodiazepin jest zjawiskiem złożonym i zależy od rodzaju benzodiazepiny oraz badanego efektu.



➤ Wykazano, że przewlekłe podawanie zarówno nieselektywnych inhibitorów syntazy NO, L-NAME i L-NOARG, jak i selektywnego inhibitora neuronalnej syntazy NO, 7-nitroindazolu, łącznie z flunitrazepamem hamowało rozwój tolerancji na zaburzenia koordynacji ruchowej w testach pręta obrotowego i komina u myszy. Zastosowanie L-argininy i sildenafilu łącznie z flunitrazepamem nie wpływało na rozwój tolerancji na powyższe efekty.

➤ Wykazano, że podanie nieselektywnych inhibitorów szlaku NO: cGMP (L-NAME i L-NOARG) hamują powstawanie benzodiazepinowych objawów odstawiennych (diazepamu, klonazepamu i chlordiazepoksydu) u myszy i szczurów.

Uzyskane wyniki badań wskazują na ważną rolę szlaku NO: cGMP w uzależniającym działaniu benzodiazepin. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu (zał. 4, pkt. II A, poz. 4; 7; 8; 10; 16 oraz zał. 4, pkt. II D, poz. 2).

#### *Rola układu glutaminianergicznego w uzależniającym działaniu benzodiazepin*

Biorąc pod uwagę fakt, że podczas rozwoju uzależnienia fizycznego od benzodiazepin dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy układem GABAergicznym i glutaminianergicznym (Stephens, 1995), można przypuszczać, że ligandy blokujące aktywność receptorów NMDA, hamują rozwój uzależnienia fizycznego od diazepamu.

Celem naszych badań było określenie zaangażowania układu glutaminianergicznego w rozwój i ekspresję tolerancji na zaburzenie koordynacji ruchowej po długotrwałym podawaniu diazepam u myszy. Koordynację ruchową zwierząt oceniano w teście pręta obrotowego i komina. Badano wpływ niekompetytywnych antagonistów receptora NMDA – ketaminy i memantyny.

➤ Wykazano, że memantyna hamuje zarówno rozwój, jak i ekspresję tolerancji na zaburzenie koordynacji ruchowej wywołanej przez diazepam. Natomiast ketamina hamuje ekspresję tolerancji, nie wpływając istotnie na jej rozwój.

Uzyskane wyniki badań wskazują na ważną rolę układu glutaminianergicznego w uzależniającym działaniu benzodiazepin. Wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu (zał. 4, pkt. II A, poz. 13).

#### *Ocena udziału receptorów glutamatergicznych w przeciwdepresyjnym działaniu cynku*

Współczesne metody leczenia depresji są względnie skuteczne, ale leki przeciwdepresyjne obciążone są dużą ilością działań niepożądanych. Dlatego poszukiwane są nowe leki. Istnieją badania naukowe, sugerujące, że jony cynku ( $Zn^{2+}$ ) wykazują działanie przeciwdepresyjne, ale mechanizm ten nie został w pełni poznany.

Jestem współautorką pracy, której celem było zbadanie udziału receptorów NMDA i AMPA w przeciwdepresyjnym działaniu cynku w teście wymuszonego pływania (*the forced swim test* – FST) u myszy i szczurów. Użyto następujących substancji: kwas N-metylo-D-asparaginowy – agonistę receptorów NMDA; kwas (E)-(DL)-2-amino-4-metylo-5-fosforo-3-pentenowy (CGP 37489) – niekompetytywnego antagonistę receptorów NMDA; 7-chloro-4-hydroksy-3(3-fenoksy) fenylchinolino-2-(H)-on (L-701,324) – antagonistę miejsca glicynowego w receptorach NMDA, maleinian (5S,10R)-(+)-5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-iminy (MK-801) – selektywnego, niekompetytywnego antagonistę receptorów NMDA; d-4-amino-3-isoksazolidon (D-cykloseryna) – częściowego agonistę receptorów NMDA; 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]chinoksalino-7-sulfonamid (NBQX) – kompetytywnego antagonistę receptorów AMPA; 2,3,6a,7,8,9-heksahydro-11H-1,4-

dioksino[2,3-g]pyrrolo[2,1-b][1,3]benzoksazolin-11-on (CX 614) – pozytywnego modulatora receptorów AMPA.

- Wykazano, że u zwierząt (myszy i szczury) podanie kwasu NMDA hamowało przeciwdepresyjne działanie cynku;
- Wykazano, że podanie niedziałających dawek antagonistów receptora NMDA (CGP 37849, L-701,324, MK-801) łącznie z niedziałającą dawką cynku wywoływało skrócenie czasu bezruchu zwierząt, a więc wywołało działanie przeciwdepresyjne.
- Wykazano, że podanie modulatora receptorów AMPA (CX 614) oraz podanie niedziałającej dawki cynku i CX 614 wywołało skrócenie czasu bezruchu zwierząt.
- Wykazano, że przeciwdepresyjne działanie cynku i modulatora receptorów AMPA (CX 614) było zniesione przez antagonistę receptorów AMPA (NBQX).
- Wykazano, że cynk zwiększa uwalnianie glutamianu i asparagianu w korze przedczołowej i hipokampie badanych zwierząt.

W niniejszej pracy wykazano, że w przeciwdepresyjnym działaniu cynku ważną rolę odgrywają receptory układu dla glutamianu, zarówno NMDA, jak i AMPA. Badania te zostały przeprowadzone we współpracy z Instytutem Farmakologii Polskiej Akademii Nauk (Zakład Neurobiologii). Wyniki badań opublikowane były w prestiżowym czasopiśmie (załącznik 4, pkt. II A, poz. 5).

#### *Ocena wpływu nanocząstek srebra (nanoAg) na aktywność OUN*

NanoAg są obecnie powszechnie wykorzystywane w przemyśle biotechnologicznym. Stanowią m.in. materiał wykorzystywany do produkcji implantów. Próbuje się je wykorzystywać jako nośnik substancji leczniczych, wykorzystując ich zdolność do przenikania bariery krew-mózg. Jednak coraz więcej doniesień sugeruje ich neurotoksyczne właściwości. Uczestniczyłam w badaniach, w których udokumentowano neurotoksyczne działanie nanoAg. Badania te zostały przeprowadzone we współpracy z Pracownią Patoneurochemii, Zakładem Neurochemii, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN.

Celem badań było określenie wpływu długotrwałego podawania nanocząsteczek srebra (nanoAg) na aktywność OUN u szczurów. Roztwór nanoAg (20 µg/ml) podawany był szczurom dorosłym przez 14 dni. Następnie przeprowadzono badania behawioralne i biochemiczne. W tkance mózgowej określono wpływ nanoAg na poziom mRNA i białka mielinowych (glikoproteiny mieliny oligodendrocytów - MOG, 2'3'-cyklicznej fosfodiesterazy nukleotydowej - CNP-azy, glikoproteiny związanej z mieliną - MAG) techniką RT-PCR *western-blot* oraz analizę ultrastrukturalną skrawków mózgowych pod kątem występowania zmian w mielinie.

- Wykazano, że przewlekła ekspozycja zwierząt na nanoAg, nie wpływa istotnie na całkowity poziom białka we frakcji mielinowej izolowanej z mózgu szczurów, jednak wywołuje istotny spadek poziomu badanych białek mielinowych - CNP-azy oraz glikoprotein MOG i MAG. Zmiany biochemiczne współwystępowały ze zmianami obserwowanymi na poziomie ultrastrukturalnym.
- W badaniach behawioralnych, nanoAg nie wpływało na zachowanie zwierząt, co mogło być spowodowane niską dawką i zbyt krótkim czasem ekspozycji zwierząt na nanoAg.

Uzyskane wyniki wskazują, że ekspozycja zwierząt na nanoAg powoduje uszkodzenie osłonek mielinowych (potencjał demielinizacyjny), a zatem wykazuje działanie neurotoksyczne. Wyniki badań opublikowano w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu (załącznik 4, pkt. II A, poz. 15).

#### *Ocena właściwości antynocyceptywnych nowych substancji*

Udokumentowanie farmakologicznej aktywności nowo zsyntetyzowanych substancji stanowi ważny kierunek badań w farmacji. Poszukiwanie substancji o właściwościach przeciwbólowych ma szczególne znaczenie, ponieważ leki, które są obecnie używane do zwalczania bólu, mają wiele działań

niepożądanych. Dlatego, we współpracy z Katedrą Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, przeprowadziłam eksperymenty, w których badałam aktywność farmakologiczną nowo zsyntetyzowanych substancji.

Celem eksperymentów była ocena właściwości antynocyceptywnych pochodnych 5-(4-chlorophenyl)-2-(morpholin-4-ylmethyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione u myszy. Nowe pochodne, zawierające dwie struktury heterocykliczne (struktura morfoliny i struktura 1,2,4-triazolu) syntetyzowane były przy użyciu reakcji Mannicha. Ich struktury chemiczne potwierdzono metodą spektroskopii w podczerwieni (IR) i jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR). Następnie przeprowadzono wstępne badania behawioralne, w których oceniano aktywność lokomotoryczną myszy (test ruchliwości – *the locomotor test*), koordynację ruchową (test pręta obrotowego – *the rota rod test*) i działanie miorelaksacyjne (test komina – *the chimney test*). Mierzono również temperaturę ciała zwierząt. Działanie antynocyceptywne nowych pochodnych oceniane było w teście gorącej płytki (*the hot plate test*) oraz w teście przeciągania (*the writhing test*).

- Wykazano, że wszystkie badane związki wykazały działanie antynocyceptywne u myszy zarówno w teście gorącej płytki, jak i przeciągania, bez wpływu na koordynację ruchową zwierząt. Nie wykazały działania miorelaksacyjnego. Dwie z badanych substancji zmniejszały ruchliwość zwierząt, co świadczy o właściwościach uspokajających i nasennych nowo zsyntetyzowanych pochodnych. Obserwowano różnice w czasie działania badanych substancji.

W niniejszych badaniach wykazaliśmy, że połączenie dwóch struktur heterocyklicznych (struktura morfoliny i struktura 1,2,4-triazolu) wywołuje działanie antynocyceptywne u myszy. Badania te opublikowane zostały w czasopiśmie międzynarodowym (załącznik 4, pkt. II A, poz. 11).

#### *Prace poglądowe*

Jestem autorem sześciu prac poglądowych, opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz krajowym, dotyczących:

- aktywności farmakologicznej benzodiazepin (załącznik 4, pkt. II D, poz. 3);
- właściwości farmakologicznych salwinoryny A (załącznik 4, pkt. II A, poz. 17);
- możliwości wykorzystania glikokortykosteroidów w chorobach alergicznych (załącznik 4, pkt. II D, poz. 4);
- możliwości zwalczania bólów migrenowych głowy (załącznik 4, pkt. II D, poz. 5);
- prawnych aspektów szczepienia ochronnego przeciwko wściekliźnie (załącznik 4, pkt. II D, poz. 6);
- znaczenia układu adenozyнового w uzależnieniu od morfiny (załącznik 4, pkt. II D, poz. 7);

#### *Prace popularno-naukowe*

Jestem autorem dwóch prac popularno-naukowych (załącznik 4, pkt. II D, poz. 8 i 9);

#### *Rozdziały w podręcznikach krajowych*

Jestem autorem rozdziału w podręczniku krajowym (dwa wydania) - załącznik 4, pkt. II E, poz. 1, 2.

### **4.3. Współpraca z jednostkami naukowo-badawczymi**

#### *współpraca z krajowymi jednostkami naukowo-badawczymi*

#### **Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie**

Katedra Biochemii i Chemii Medycznej,

Katedra i Zakład Fizjologii,

Zakład Biochemii i Żywienia Człowieka

**Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie**

Zakład Neurochemii  
Zakład Neurobiologii

**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie**

Pracownia Patoneurochemii Zakładu Neurochemii

**Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie**

Katedra Anatomii Patologicznej

*współpraca w obrębie Uniwersytetu Medycznego w Lublinie*

Katedra Chemii Organicznej  
Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej

*współpraca w obrębie macierzystej Katedry*

prof. dr hab. Sylwia Fidecka (profesor emerytowany) – udział w planowaniu doświadczeń, interpretowaniu wyników, przygotowywaniu publikacji;

prof. dr hab. Jolanta Kotlińska – udział w planowaniu doświadczeń, interpretowaniu wyników, przygotowywaniu publikacji (od 2016 r.);

dr n. farm. Sylwia Talarek – udział w wykonywaniu badań behawioralnych;

dr n. farm. Jolanta Orzelska – udział w wykonywaniu badań behawioralnych;

mgr farm. Małgorzata Łupina – udział w wykonywaniu badań behawioralnych (od 2015 r.);

**4.4. Kierowanie projektami badawczymi oraz udział w projektach****1. Kierownik projektu finansowanego z funduszy Uniwersytetu Medycznego w Lublinie:**

- PW 72/2008 - projekt na pracę własną „Rola układu adenozyнового w procesie uzależnienia” (projekt realizowany był w latach 2008-2009);
- PW 72/2010 - projekt na pracę własną „Badania mechanizmów sensytyzacji behawioralnej u zwierząt doświadczalnych” (projekt realizowany był w 2010 roku);

Od początku mojej pracy byłam wielokrotnie wykonawcą w projektach statutowych realizowanych pod kierownictwem prof. dr hab. Sylwii Fideckiej w Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką, UM w Lublinie;

Trzykrotnie, jako kierownik, składałam wnioski do Narodowego Centrum Nauki (NCN) o sfinansowanie badań, ale wnioski nie uzyskały akceptacji Komisji:

1. Udział receptorów adenozyновых w zaangażowanie oreksyn (hipokretyn) w proces uzależnienia od morfiny (OPUS 4, 2012 rok);
2. Wpływ długotrwałej ekspozycji na jony fluoru, podawanych szczurom w okresie prenatalnym i pourodzeniowym, na rozwój uzależnienia od nikotyny i etanolu osobników (OPUS 5, 2014);
3. Badania mechanizmów uzależnienia od morfiny u szczurów - znaczenie stanu zapalnego w centralnym układzie nerwowym (SONATA 5 bis, 2015);

Ponadto, jako główny wykonawca, uczestniczyłam w przygotowaniu wniosków o finansowanie badań do NCN. Nie uzyskały akceptacji. Ostatni jest aktualnie rozpatrywany:

4. Ocena udziału czynników środowiskowych w uzależnieniu fizycznym od nikotyny i etanolu u szczurów - rola długotrwałej ekspozycji (okres prenatalny i pourodzeniowy) na jony fluoru. Badania

- behawioralne, molekularne, immunohistochemiczne i neurochemiczne (OPUS 9, 2015) – **projekt został zakwalifikowany do II-go etapu oceny merytorycznej;**
5. Ocena udziału czynników środowiskowych w uzależnieniu fizycznym od nikotyny i etanolu u szczurów - rola długotrwałej ekspozycji (okres prenatalny i pourodzeniowy) na jony fluoru. Badania behawioralne, molekularne, immunohistochemiczne i neurochemiczne (OPUS 10, 2015);
  6. Wpływ podawania nowych psychoaktywnych substancji (mefedron) w okresie młodzieńczym na fenotyp dorosłych osobników; przedkliniczne badania behawioralne i neurochemiczne nad aktywnością metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9) w mózgu szczura (OPUS 11, 2016) – **projekt został zakwalifikowany do II-go etapu oceny merytorycznej;**
  7. Wpływ podawania katynonów, na przykładzie mefedronu, w okresie młodzieńczym i na fenotyp dorosłych osobników - przedkliniczne badania behawioralne i neurochemiczne nad aktywnością metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9) w mózgu szczurów (OPUS 12, 2016) - **– projekt został zakwalifikowany do II-go etapu oceny merytorycznej; i jest obecnie rozpatrywany;**

#### **4.5. Międzynarodowe i krajowe nagrody oraz odznaczenia związane z działalnością naukową**

- 2008 r. – Nagroda Rektora UM w Lublinie II stopnia za osiągnięcia naukowe;
- 2010 r. – Nagroda Rektora UM w Lublinie II stopnia za osiągnięcia naukowe;
- 2012 r. – Nagroda Rektora UM w Lublinie II stopnia za osiągnięcia naukowe;
- 2014 r. – Nagroda Rektora UM w Lublinie II stopnia za osiągnięcia naukowe;
- 2016 r. – Nagroda Rektora UM w Lublinie III stopnia za osiągnięcia naukowe;

#### **4.6. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych**

W latach 2009-2017 byłam autorem 35 recenzji artykułów naukowych:

- dla czasopism z listy filadelfijskiej – 9;
  1. International Journal of Developmental Neuroscience – 2009
  2. Pharmacological Reports – 2012
  3. Neuropsychiatry – 2016
  4. Immunologic Research – 2016
  5. European Journal of Experimental Biology - 2016
  6. Neurochemistry International – 2016
  7. Imagine in Medicine – 2016
  8. Imagine in Medicine – 2016
  9. European Journal of Experimental Biology – 2017
- dla czasopism nie będących na liście filadelfijskiej – 26;

#### **4.7. Staże w zagranicznych lub krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich**

2-13.09.2013 r. – odbyłam staż naukowy z technik badawczych w biologii molekularnej (analiza Western blotting, test ELISA) w Zakładzie Biochemii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie;

03. 2016 r. – odbyłam staż naukowy w zakresie izolacji struktur mózgu do badań biochemicznych i molekularnych w Instytucie Farmakologii PAN;

16.05-21.05.2016 – odbyłam szkolenie dla nauczycieli akademickich w ramach programu Erasmus Plus, Uniwersytet w Lizbonie, Katedra Farmakologii i Farmakognozji, Portugalia;

06.2016 r. – odbyłam staż naukowy w zakresie technik badawczych stosowanych w badaniach genetycznych (analiza RT-PCR) w Pracowni Genetyki Sądowej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej z Pracownią Toksykologii Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie;

#### 4.8. Promotorstwo i opieka nad naukowymi pracami studenckimi

Byłam opiekunem naukowym 17 i promotorem 3 doświadczalnych prac magisterskich wykonywanych przez studentów kierunku Farmacja w Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką, UM w Lublinie;

Byłam promotorem 2 prac magisterskich teoretycznych wykonywanych przez studentki kierunku Kosmetologia UM w Lublinie;

Od 1.10.2015 r. jestem opiekunem naukowym doktorantki mgr farm. Małgorzaty Łupiny. Roboczy tytuł pracy doktorskiej: „Poszukiwanie nowych strategii w terapii uzależnienia od morfiny”. Praca realizowana jest Katedrze i Zakładzie Farmakologii z Farmakodynamiką, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej w Lublinie. Planowany termin obrony pracy doktorskiej – 2019 r.

#### 4.9. Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych

- Jestem autorem 30 publikacji (w 14-tu jestem pierwszym autorem). Prace te obejmują:
  - 24 oryginalnych prac naukowych
  - 6 prac poglądowych
- Jestem autorem 34 prezentacji wyników badań na konferencjach naukowych międzynarodowych i krajowych, w tym:
  - 24 prezentacji na konferencjach międzynarodowych (w tym 3 prezentacje ustne)
  - 10 prezentacji na konferencjach krajowych (w tym 2 prezentacje ustne)
- Sumaryczny impact factor (IF) publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **IF=63,724**, co stanowi **615 punktów KBN/MNiSW**
- Liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) według bazy Web of Science (WoS): 110
- Liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) według bazy Scopus: 124
- Indeks Hirscha publikacji według bazy Web of Science (WoS): 8
- Indeks Hirscha publikacji według bazy Scopus: 6

Szczegółowe dane dotyczące liczby publikacji oraz ich punktacji przedstawiono w poniższych tabelach:

Liczba publikacji	przed doktoratem		po doktoracie	
	bez IF	z IF	bez IF	z IF
prace doświadczalne [w tym jako 1 autor]	1 [1]	2 [2]	1 [0]	20 [8]
prace poglądowe [w tym jako 1 autor]	0	0	5 [2]	1 [1]
razem		3 [3]		28 [11]
<b>RAZEM</b>				<b>30 [14]</b>

Tabela 1. Liczbowy wykaz publikacji wchodzących w skład dorobku naukowego autorki

Punktacja publikacji	przed doktoratem		po doktoracie	
	bez IF	z IF	bez IF	z IF
prace doświadczalne – IF	0	3,699	0	57,58
[prace doświadczalne - KBN/MNiSW]	[0]	[30]	[9]	[541]
prace poglądowe - IF	0	0	0	2,445
[prace poglądowe - KBN/MNiSW]	[0]	[0]	[15]	[20]
razem		3,699 [30]		60,025 [589]
<b>RAZEM – IF</b>			<b>63,724</b>	
<b>RAZEM – KBN/MNiSW</b>			<b>[615]</b>	

Tabela 2. Szczegółowy wykaz punktacji publikacji wchodzących w skład dorobku naukowego autorki

### Piśmiennictwo

- Abbracchio MP, Brambilla R, Ceruti S, Kim HO, von Lubitz DK, Jacobson KA, Cattabeni F. G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 1995, 48, 1038-1045.
- Ahlijanian MK, Takemori AE. Changes in adenosine receptor sensitivity in morphine-tolerant and -dependent mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986, 236, 615–620.
- Al-Hasani R, Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* 2011, 115, 1363–1381.
- Allgaier C, Hertting G, Kügelgen OV. The adenosine receptor-mediated inhibition of noradrenaline release possibly involves an N-protein and is increased by alpha 2-autoreceptor blockade. *Br. J. Pharmacol.* 1987, 90, 403-412.
- Ansari HR, Teng B, Nadeem A, Roush KP, Martin KH, Schnermann J, Mustafa SJ. A(1) adenosine receptor-mediated PKC and p42/p44 MAPK signaling in mouse coronary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009, 297, H1032-1039.
- Audesirk G, Audesirk T. The effects of inorganic lead on voltage-sensitive calcium channels differ among cell types and among channel subtypes. *NeuroToxicology* 1993, 14, 259-266.
- Baranowska-Bosiacka I, Dąbrowska-Bouta B, Strużyńska L. Regional changes in purines and selected purinergic receptors in immature rat brain exposed to lead. *Toxicology* 2011a, 279, 100–107.
- Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Marchetti C, Rutkowska M, Marchlewicz M, Kolasa A, Prokopowicz A, Wiernicki I, Piotrowska K, Baškiewicz M, Safranow K, Wiszniewska B, Chlubek D. Altered energy status of primary cerebellar granule neuronal cultures from rats exposed to lead in the pre- and neonatal period. *Toxicology* 2011b, 280, 24–32.
- Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Marchlewicz M, Marchetti C, Kurzawski M, Dziedziczko V, Kolasa A, Olszewska M, Rybicka M, Safranow K, Nowacki P, Wiszniewska B, Chlubek D. Disrupted pro- and antioxidative balance as a mechanism of neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead. *Brain Res.* 2012, 1435, 56-71.
- Baranowska-Bosiacka I, Strużyńska L, Gutowska I, Machalińska A, Kolasa A, Kłós P, Czapski GA, Kurzawski M, Prokopowicz A, Marchlewicz M, Safranow K, Machaliński B, Wiszniewska B, Chlubek D. Perinatal exposure to lead induces morphological, ultrastructural and molecular alterations in the hippocampus. *Toxicology* 2013, 303C, 187–200.
- Barton HJ. Advantages of the use of deciduous teeth, hair, and blood analysis for lead and cadmium bio-monitoring in children. A study of 6-year-old children from Krakow (Poland). *Biol. Trace Elem. Res.* 2011, 143, 637–658.
- Basha R, Reddy GR. Developmental exposure to lead and late life abnormalities of nervous system. *Indian J. Exp. Biol.* 2010, 48, 636–641.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* 1993, 13, 4181-4192.
- Bellinger D, Leviton A, Allred E, Rabinowitz M. Pre- and postnatal lead exposure and behavior problems in school-aged children. *Environ. Res.* 1994, 66, 12-30.

- Bilecki W, Zapart G, Ligeza A, Wawrzczak-Bargiela A, Urbański MJ, Przewłocki R. Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005, 62, 2369-2375.
- Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2014. *Peptides* 2016, 75, 18-70.
- Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 2000, 408, 720-723.
- Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT. Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* 1999, 286, 2495-2498.
- Borgkvist A, Valjent E, Santini E, Hervé D, Girault JA, Fisone G. Delayed, context- and dopamine D1 receptor-dependent activation of ERK in morphine-sensitized mice. *Neuropharmacology* 2008, 55, 230-237.
- Braun JM, Kahn RS, Froehlich T, Auinger P, Lanphear BP. Exposures to environmental toxicants and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children. *Environ. Health Perspect.* 2006, 14, 1904-1909.
- Brundage JM, Williams JT. Increase in adenosine sensitivity in the nucleus accumbens following chronic morphine treatment. *J. Neurophysiol.* 2002, 87, 1369-1375.
- Burnstock G. P2X ion channel receptors and inflammation. *Purinergic Signal.* 2016, 12, 59-67.
- Cao JL, He JH, Ding HL, Zeng YM. Activation of the spinal ERK signaling pathway contributes to naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent rats. *Pain* 2005, 118, 336-349.
- Carlezon Jr WA, Rasmussen K, Nestler EJ. AMPA antagonist LY293558 blocks the development, without blocking the expression, of behavioral sensitization to morphine. *Synapse* 1999, 31, 256-262.
- Charles MP, Adamski D, Kholler B, Pelletier L, Berger F, Wion D. Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by the bacterial nucleoside N6-methyldeoxyadenosine is mediated through adenosine A2a receptors and via cAMP and MAPK signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 304, 795-800.
- Ciruela F, Casadó V, Rodrigues RJ, Luján R, Burgueño J, Canals M, Borycz J, Rebola N, Goldberg SR, Mallol J, Cortés A, Canela EI, López-Giménez JF, Milligan G, Lluís C, Cunha RA, Ferré S, Franco R. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J. Neurosci.* 2006, 26, 2080-2087.
- Clarkson T. Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1993, 32, 545-571.
- Coon S, Stark A, Peterson E, Gloi A, Kortsha G, Pounds J, Chettle D, Gorell J. Whole-body lifetime occupational lead exposure and risk of Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 2006, 114, 1872-1876.
- Cordova FM, Rodrigues AL, Giacomelli MB, Oliveira CS, Posser T, Dunkley PR, Leal RB. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res.* 2004, 998, 65-72.
- Corradetti R, Lo Conte G, Moroni F, Passani MB, Pepeu G. Adenosine decreases aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. *Eur. J. Pharmacol.* 1984, 104, 19-26.
- Cunha RA, Johansson B, van der Ploeg I, Sebastião AM, Ribeiro JA, Fredholm BB. Evidence for functionally important adenosine A2a receptors in the rat hippocampus. *Brain Res.* 1994, 649, 208-216.
- Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 2001, 38, 107-125.
- Dang VC, Christie MJ. Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. *Br. J. Pharmacol.* 2012, 165, 1704-17016.
- de Mendonça A, Sebastião AM, Ribeiro JA. Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation. *Neuroreport* 1995, 6, 1097-1100.
- Di Chiara G. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, 393, 295-314.
- Diaz SL, Kemmling A, Balerio GN. Baclofen reestablishes striatal and cortical dopamine concentrations during naloxone-precipitated withdrawal. *Neurochem. Int.* 2003, 42, 293-298.
- Dixon AK, Widdowson L, Richardson PJ. Desensitisation of the adenosine A1 receptor by the A2A receptor in the rat striatum. *J. Neurochem.* 1997, 69, 315-321.
- Done C, Silverstone P, Sharp T. Effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal on noradrenaline release in rat hippocampus in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 1992, 215, 333-336.
- Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Swanson RA. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci.* 2003, 23, 1320-1328.



- Eidson LN, Inoue K2, Young LJ, Tansey MG, Murphy AZ. Toll-like Receptor 4 Mediates Morphine-Induced Neuroinflammation and Tolerance via Soluble Tumor Necrosis Factor Signaling. *Neuropsychopharmacology* 2017, 42, 661-670.
- Environmental Protection, Statutory Instruments. The restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment regulations, 2005, No. 2748. [http://www.legislation.gov.uk/ukxi/2005/2748/pdfs/ukxi\\_20052748\\_en.pdf](http://www.legislation.gov.uk/ukxi/2005/2748/pdfs/ukxi_20052748_en.pdf), (data odczytu: styczeń, 2017).
- Evans CJ, Cahill CM. Neurobiology of opioid dependence in creating addiction vulnerability. *F1000Res*. 2016, 5, F1000 Faculty Rev-1748.
- Fan XL, Zhang JS, Zhang XQ, Yue W, Ma L. Differential regulation of beta-arrestin 1 and beta-arrestin 2 gene expression in rat brain by morphine. *Neuroscience* 2003, 117, 383-389.
- Ferré S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K. Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1991, 7238-7241.
- Ferré S, Popoli P, Giménez-Llort L, Finnman UB, Martínez E, Scotti de Carolis A, Fuxe K. Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A1 and dopamine D1 receptors. *Neuroreport* 1994a, 6, 73-76.
- Ferré S, O'Connor WT, Snaprud P, Ungerstedt U, Fuxe K. Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience* 1994b, 63, 765-773.
- Ferré S, Popoli P, Tinner-Staines B, Fuxe K. Adenosine A1 receptor–dopamine D1 receptor interaction in the rat limbic system: modulation of dopamine D1 receptor antagonist binding sites. *Neurosci. Lett.* 1996, 208, 109–112.
- Feuerstein TJ, Bär KI, Lücking CH. Activation of A1 adenosine receptors decreases the release of serotonin in the rabbit hippocampus, but not in the caudate nucleus. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1988, 338, 664-670.
- Florán B, Barajas C, Florán L, Erlij D, Aceves J. Adenosine A1 receptors control dopamine D1-dependent [(3)H]GABA release in slices of substantia nigra pars reticulata and motor behavior in the rat. *Neuroscience* 2002, 115, 743-751.
- Fox ME, Rodeberg NT, Wightman RM. Reciprocal catecholamine changes during opiate exposure and withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 2017, 42, 671-681.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2001, 53, 527–552.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol. Rev.* 2011, 63, 1-34.
- Fredholm BB. Adenosine--a physiological or pathophysiological agent? *J. Mol. Med.* 2014, 92, 201-206.
- Gallo V, Ghiani CA. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol. Sci.* 2000, 21, 252-258.
- González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J. Neuroimmunol.* 2014, 274, 1-13.
- Goodman A. Neurobiology of addiction. An integrative review. *Biochem. Pharmacol.* 2008, 75, 266-322.
- Gourgiotis I, Kampouri NG, Koulouri V, Lempeis IG, Prasinou MD, Georgiadou G, Pitsikas N. Nitric oxide modulates apomorphine-induced recognition memory deficits in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2012, 102, 507-514.
- Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol.* 2014, 13, 330-338.
- Guegan T, Cebrià JP, Maldonado R, Martín M. Morphine-induced locomotor sensitization produces structural plasticity in the mesocorticolimbic system dependent on CB1-R activity. *Addict. Biol.* 2016, 21, 1113-1126.
- Holtzman D, DeVries C, Nguyen H, Olson J, Bensch K. Maturation of resistance to lead encephalopathy: cellular and subcellular mechanisms. *Neurotoxicology* 1984, 5, 97-124.
- Hossain S, Bhowmick S, Jahan S, Rozario L, Sarkar M, Islam S, Basunia MA, Rahman A, Choudhury BK, Shahjalal H. Maternal lead exposure decreases the levels of brain development and cognition-related proteins with concomitant upsurges of oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in the offspring rats. *Neurotoxicology* 2016, 56, 150-158.
- Hu H, Téllez-Rojo MM, Bellinger D, Smith D, Ettinger AS, Lamadrid-Figueroa H, Schwartz J, Schnaas L, Mercado-García A, Hernández-Avila M. Fetal lead exposure at each stage of pregnancy as a predictor of infant mental development. *Environ. Health Perspect.* 2006, 114, 1730-1735.

- Jakubowski M. Low-level environmental lead exposure and intellectual impairment in children-the current concepts of risk assessment. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 2011, 24, 1–7.
- Jeziorski M, White FJ, Wolf ME. MK-801 prevents the development of behavioral sensitization during repeated morphine administration. *Synapse* 1994, 16, 137–147.
- Jeziorski M, White FJ. Dopamine receptor antagonists prevent expression, but not development, of morphine sensitization. *Eur. J. Pharmacol.* 1995, 275, 235-244.
- Kala SV, Jadhav AL. Region-specific alterations in dopamine and serotonin metabolism in brains of rats exposed to low levels of lead. *Neurotoxicology* 1995, 16, 297-308.
- Kalivas PW, Duffy P. Sensitization to repeated morphine injection in the rat: possible involvement of A10 dopamine neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987, 241, 204–212.
- Kaplan GB, Leite-Morris KA, Sears MT. Alterations of adenosine A1 receptors in morphine dependence. *Brain Res.* 1994, 657, 347-350.
- Kaplan GB, Leite-Morris KA. Up-regulation of adenosine transporter-binding sites in striatum and hypothalamus of opiate tolerant mice. *Brain Res.* 1997, 763, 215–220.
- Kehr W. 3-Methoxytyramine as an indicator of impulse-induced dopamine release in rat brain in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1976, 293, 209-215.
- Kern M, Wisniewski M, Cabell L, Audesirk G. Inorganic lead and calcium interact positively in activation of calmodulin. *Neurotoxicology* 2000, 21, 353–363.
- Klaasse EC, Ijzerman AP, de Grip WJ, Beukers MW. Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signal.* 2008, 4, 21-37.
- Klishin A, Tsintsadze T, Lozovaya N, Krishtal O. Latent N-methyl-D-aspartate receptors in the recurrent excitatory pathway between hippocampal CA1 pyramidal neurons: Ca(2+)-dependent activation by blocking A1 adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 12431–12435.
- Koob GF, Ahmed SH, Boutrel B, Chen SA, Kenny PJ, Markou A, O'Dell LE, Parsons LH, Sanna PP. Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2004, 27, 739-749.
- Koob GF, Stinus L, Le Moal M, Bloom FE. Opponent process theory of motivation: neurobiological evidence from studies of opiate dependence. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1989, 13, 135-140.
- Lasley SM, Gilbert ME. Rat hippocampal glutamate and GABA release exhibit biphasic effects as a function of chronic lead exposure level. *Toxicol. Sci.* 2002, 66, 139-147.
- Law PY, Loh HH, Wei LN. Insights into the receptor transcription and signaling: implications in opioid tolerance and dependence. *Neuropharmacology* 2004, 47, 300-311.
- Law PY, Wong YH, Loh HH. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000, 40, 389-430.
- Le Moal M, Simon H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol. Rev.* 1991, 71, 155–234.
- Leret ML, Garcia-Uceda F, Antonio MT. Effects of maternal lead administration on monoaminergic, GABAergic and glutamatergic systems. *Brain Res. Bull.* 2002, 58, 469–473.
- Li DP, Chen SR, Finnegan TF, Pan HL. Signalling pathway of nitric oxide in synaptic GABA release in the rat paraventricular nucleus. *J. Physiol.* 2004, 554, 100-110.
- Li H, Henry JL. Adenosine receptor blockade reveals N-methyl-D-aspartate receptor- and voltage-sensitive dendritic spikes in rat hippocampal CA1 pyramidal cells in vitro. *Neuroscience* 2000, 100, 21–31.
- Li Y, Liu X, Liu C, Kang J, Yang J, Pei G, Wu C. Improvement of morphine-mediated analgesia by inhibition of  $\beta$ -Arrestin 2 expression in mice periaqueductal gray matter. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 954-963.
- Liu GJ, Kalous A, Werry EL, Bennett MR. Purine release from spinal cord microglia after elevation of calcium by glutamate. *Mol. Pharmacol.* 2006, 70, 851–859.
- Liu J, Liu X, Wang W, McCauley L, Pinto-Martin J, Wang Y, Li L, Yan C, Rogan WJ. Blood lead levels and children's behavioral and emotional Problems: A Cohort Study. *JAMA Pediatr.* 2014, 168, 737–745.
- Liu XS, Hou Y, Yan TL, Guo YY, Han W, Guan FL, Chen T, Li T. Dopamine D3 receptor-regulated NR2B subunits of N-methyl-d-aspartate receptors in the nucleus accumbens involves in morphine-induced locomotor activity. *CNS Neurosci. Ther.* 2014, 20, 823-829.
- Lopes LV, Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine and related drugs in brain diseases: present and future in clinical trials. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011, 11, 8, 1087-1101.
- Macey TA, Bobeck EN, Hegarty DM, Aicher SA, Ingram SL, Morgan MM. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation counteracts morphine tolerance in the periaqueductal gray of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009, 331, 412-418.

- Mansouri MT, Naghizadeh B, López-Larrubia P, Cauli O. Behavioral deficits induced by lead exposure are accompanied by serotonergic and cholinergic alterations in the prefrontal cortex. *Neurochem. Int.* 2013, 62, 232-239.
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro. Sensitization to the rewarding effects of morphine depends on dopamine. *J. Neuroreport.* 2005, 16, 201-205.
- Marchetti C, Gavazzo P. NMDA receptors as targets of heavy metal interaction and toxicity. *Neurotox. Res.* 2005, 8, 245-258.
- Marchi M, Raiteri L, Risso F, Vallarino A, Bonfanti A, Monopoli A, Ongini E, Raiteri M. Effects of adenosine A1 and A2A receptor activation on the evoked release of glutamate from rat cerebrocortical synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.* 2002, 136, 434-440.
- Matinfar M, Esfahani MM, Aslany N, Davoodi SH, Parsaei P, Zarei G, Reisi P. Effect of repeated morphine withdrawal on spatial learning, memory and serum cortisol level in mice. *Adv. Biomed. Res.* 2013, 2, 80.
- Mayfield RD, Jones BA, Miller HA, Simosky JK, Larson GA, Zahniser NR. Modulation of endogenous GABA release by an antagonistic adenosine A1/dopamine D1 receptor interaction in rat brain limbic regions but not basal ganglia. *Synapse* 1999, 33, 274-281.
- Mayfield RD, Larson G, Orona RA, Zahniser NR. Opposing actions of adenosine A2a and dopamine D2 receptor activation on GABA release in the basal ganglia: evidence for an A2a/D2 receptor interaction in globus pallidus. *Synapse* 1996, 22, 132-138.
- Mazzolini M, Traverso S, Marchetti C. Multiple pathways of Pb(2+) permeation in rat cerebellar granule neurones. *J. Neurochem.* 2001, 79, 407-416.
- Mediero A, Perez-Aso M, Cronstein BN. Activation of adenosine A(2A) receptor reduces osteoclast formation via PKA- and ERK1/2-mediated suppression of NFκB nuclear translocation. *Br. J. Pharmacol.* 2013, 169, 1372-1388.
- Mendola P, Selevan SG, Gutter S, Rice D. Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard Dev. Disabil. Res. Rev.* 2002, 8, 188-197.
- Meye FJ, van Zessen R, Smidt MP, Adan RA, Ramakers GM. Morphine withdrawal enhances constitutive μ-opioid receptor activity in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 2012, 32, 16120-16128.
- Miguel-Hidalgo JJ. The Role of Glial Cells in Drug Abuse. *Curr. Drug Abuse Rev.* 2009, 2, 76-82.
- Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U. A new benzodiazepine pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002, 300, 2-8.
- Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL. Mu- and kappa-opioid receptors selectively reduce the same transient components of high-threshold calcium current in rat dorsal root ganglion sensory neurons. *J. Neurosci.* 1994, 14, 5903-5916.
- Murakami K, Feng G, Chen SG. Inhibition of brain protein kinase C subtypes by lead. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993, 264, 757-761.
- Needleman HL, Gatsonis CA. Low-level lead exposure and the IQ of children. A meta-analysis of modern studies. *JAMA.* 1990, 263, 673-678.
- Nikbakht MR, Stone TW. Suppression of presynaptic responses to adenosine by activation of NMDA receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 2001, 427, 13-25.
- North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1987, 84, 5487-5491.
- Nutt DJ, King LA, Phillips LD. Drug harms in the UK: a multicriteria decision analysis. *Lancet* 2010, 376, 1558-1565.
- Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet S, Schousboe A, Haydon PG, Stout RF, Spray DC, Reichenbach A, Pannicke T, Pekny M, Pekna M, Zorec R, Verkhratsky A. Glial cells in (patho)physiology. *J. Neurochem.* 2012, 121, 4-27.
- Pentylala S, Ruggeri J, Veerajulu A, Yu Z, Bhatia A, Desai D, Vig P. Microsomal Ca<sup>2+</sup> flux modulation as an indicator of heavy metal toxicity. 2010, 48, 7, 737-43.
- Pinto-Duarte A, Coelho JE, Cunha RA, Ribeiro JA, Sebastião AM. Adenosine A2A receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 2005, 93, 595-604.
- Popoli P, Betto P, Reggio R, Ricciarello G. Adenosine A2A receptor stimulation enhances striatal extracellular glutamate levels in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1995, 287, 215-217.
- Randall CK, Kraemer PJ, Bardo MT. Morphine-induced conditioned place preference in preweanling and adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998, 60, 217-222.

- Reisi Z, Bani-Ardalan M, Zarepour L, Haghparast A. Involvement of D1/D2 dopamine receptors within the nucleus accumbens and ventral tegmental area in the development of sensitization to antinociceptive effect of morphine. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014, 118, 16-21.
- Ribeiro JA, Sebastião AM, de Mendonça A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* 2002, 68, 377-392.
- Ribeiro FF, Xapelli S, Miranda-Lourenço C, Tanqueiro SR, Fonseca-Gomes J, Diógenes MJ, Ribeiro JA, Sebastião AM. Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. *Neuropharmacology* 2016, 104, 226-242.
- Robinson TE, Berridge KC. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2008, 363, 3137–3146.
- Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Rev.* 1993, 18, 247–291.
- Robinson TE, Berridge KC. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 2000, 95, 91-117.
- Robinson TE, Kolb B. Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 2004, 47, 33-46.
- Rossi E. Low level environmental lead exposure – a continuing challenge. *Clin. Biochem. Rev.* 2008, 29, 63–70.
- Rothwell PE, Gewirtz JC, Thomas MJ. Episodic withdrawal promotes psychomotor sensitization to morphine. *Neuropsychopharmacology* 2010, 35, 2579-2589.
- Sadeghi B, Ezzatpanah S, Haghparast A. Effects of dorsal hippocampal orexin-2 receptor antagonism on the acquisition, expression, and extinction of morphine-induced place preference in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2016, 233, 2329-2341.
- Sahraei H, Zarei F, Eidi A, Oryan S, Shams J, Khoshbaten A, Zarrindast MR. The role of nitric oxide within the nucleus accumbens on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in morphine sensitized rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2007, 556, 99-106.
- Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Muñoz M, Berrocoso E, Garzón J. The plasticity of the association between mu-opioid receptor and glutamate ionotropic receptor N in opioid analgesic tolerance and neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 2013, 716, 94-105.
- Sandhir R, Gill KD. Calmodulin and cAMP dependent synaptic vesicle protein phosphorylation in rat cortex following lead exposure. *Int. J Biochem.* 1994, 26, 12, 1383–1389.
- Sawynok J, Jhamandas KH. Inhibition of acetylcholine release from cholinergic nerves by adenosine, adenine nucleotides and morphine: antagonism by theophylline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1976, 197, 379-390.
- Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal.* 2003, 15, 813-827.
- Sebastião AM, de Mendonça A, Moreira T, Ribeiro JA. Activation of synaptic NMDA receptors by action potential-dependent release of transmitter during hypoxia impairs recovery of synaptic transmission on reoxygenation. *J. Neurosci.* 2001, 21, 8564-8571.
- Sebastiao AM, Ribeiro FF, Ribeiro JA. From A1 to A3 en passant through A(2A) receptors in the hippocampus: pharmacological implications. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2012, 11, 652-663.
- Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009, 193, 471-534.
- Sepulveda MJ, Hernandez L, Rada P, Tucci S, Contreras E. Effect of precipitated withdrawal on extracellular glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of chronically morphine-treated rats: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998, 60, 255-262.
- Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1977, 74, 3365-3369.
- Shippenberg TS, Heidbreder C. Sensitization to the conditioned rewarding effects of cocaine: pharmacological and temporal characteristics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995, 273, 808-815.
- Song P, Zhao ZQ. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosci. Res.* 2001, 39, 281-286.
- Spanagel R, Almeida OFX, Shippenberg TS. Long lasting changes in morphine-induced mesolimbic dopamine release after chronic morphine exposure. *Synapse* 1993, 14, 243–245.
- Spanagel R, Shippenberg TS. Modulation of morphine induced sensitization by endogenous kappa opioid systems in the rat. *Neurosci. Lett.* 1993, 153, 232–236.

- Stephens DN. A glutamatergic hypothesis of drug dependence: extrapolations from benzodiazepine receptor ligands. *Behav. Pharmacol.* 1995, 6, 425-446.
- Strużyńska L, Dabrowska-Bouta B, Koza K, Sulkowski G. Inflammation-like glial response in lead-exposed immature rat brain. *Toxicol. Sci.* 2007, 95, 156-162.
- Suadcani SO, Brosnan CF, Scemes E. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *J. Neurosci.* 2006, 26, 1378-1385.
- Tjon GHK, De Vries TJ, Ronken E, Hogenboom F, Wardeh G, Mulder AH, Schoffelmeer AN. Repeated and chronic morphine administration causes differential long-lasting changes in dopaminergic neurotransmission in rat striatum without changing its  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptor regulation. *Eur. J. Pharmacol.* 1994, 252, 205-212.
- Tjon GHK, Voorn P, Vanderschuren LJM, De Vries TJ, Michiels NHLM, Jonker AJ, Klop H, Nestby P, Mulder AH, Schoffelmeer AN. Delayed occurrence of enhanced striatal preprodynorphin gene expression in behaviorally sensitized rats: differential long-term effects of intermittent and chronic morphine administration. *Neuroscience* 1997, 76, 167-176.
- Toscano CD, Guilarte TR. Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2005, 49, 529-554.
- Toscano CD, O'Callaghan JP, Guilarte TR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity and expression are altered in the hippocampus of Pb<sup>2+</sup>-exposed rats. *Brain Res.* 2005, 1044, 51-58.
- Vanderschuren LJ, Kalivas PW. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* 2000, 151, 99-120.
- Vanderschuren LJ, Pierce RC. Sensitization processes in drug addiction. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2010, 3, 179-95.
- Ward BO, Stephens DN. Sensitisation of withdrawal signs following repeated withdrawal from a benzodiazepine: differences between measures of anxiety and seizure sensitivity. *Psychopharmacology (Berl)* 1998, 135, 342-352.
- Whistler JL, Chuang HH, Chu P, Jan LY, von Zastrow M. Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: Implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* 1999, 23, 737-746.
- Wise RA, Rompre PP. Brain dopamine and reward. *Annu. Rev. Psychol.* 1989, 40, 191-225.
- Wolf ME. LTP may trigger addiction. *Mol. Interv.* 2003, 3, 248-252.
- Wood PL, Kim HS, Boyar WC, Hutchison A. Inhibition of nigrostriatal release of dopamine in the rat by adenosine receptor agonists: A1 receptor mediation. *Neuropharmacology* 1989, 28, 21-25.
- Xie W, Samoriski GM, McLaughlin JP, Romoser VA, Smrcka A, Hinkle PM, Bidlack JM, Gross RA, Jiang H, Wu D. Genetic alteration of phospholipase C beta3 expression modulates behavioral and cellular responses to mu opioids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999, 96, 10385-10390.
- Zanelli S, Naylor M, Kapur J. Nitric oxide alters GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons *Brain Res.* 2009, 1297, 23-31.
- Zhang G, Wu X, Zhang YM, Liu H, Jiang Q, Pang G, Tao X, Dong L, Stackman RW Jr. Activation of serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor suppresses behavioral sensitization and naloxone-precipitated withdrawal symptoms in morphine-dependent mice. *Neuropharmacology* 2016, 101, 246-254.
- Zhou Y, Bendor J, Hofmann L, Randesi M, Ho A, Kreek MJ. Mu opioid receptor and orexin/hypocretin mRNA levels in the lateral hypothalamus and striatum are enhanced by morphine withdrawal. *J. Endocrinol.* 2006, 191, 137-145.

Joanna Listos