

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

dr Anna Błasiak

AUTOREFERAT

Kraków, sierpień 2017

1. Imię i nazwisko: Anna Błasiak

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2007 Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii otrzymany z wyróżnieniem, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie.
Tytuł rozprawy: **„Wpływ neuroprzekaźników układu synchronizującego rytmy okołodobowe ssaków na aktywność struktur zegara biologicznego szczura w preparacie *in vitro*"**.
Promotor: prof. dr hab. Marian Henryk Lewandowski

2002 Tytuł magistra biologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie.
Tytuł rozprawy: **„Endo- czy egzogenne pochodzenie ultradialnej aktywności listka ciała kolankowatego bocznego? Rola szlaku kolankowo-kolankowatego"**.
Promotor: prof. dr hab. Marian Henryk Lewandowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od XI 2010 adiunkt w zakładzie Neurofizjologii i Chronobiologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

2008-2010 asystent w zakładzie Neurofizjologii i Chronobiologii Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Udział relaksyny-3 i receptorów RXFP3 w neuronalnym mechanizmie zegara biologicznego ssaków i zachowań związanych z motywacją

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

1. Blasiak A*, Blasiak T, Lewandowski MH, Hossain MA, Wade JD, Gundlach AL*. **Relaxin-3 innervation of the intergeniculate leaflet of the rat thalamus - neuronal tract-tracing and *in vitro* electrophysiological studies** (2013) European Journal of Neuroscience 37:1284-94. doi: 10.1111/ejn.12155.
   IF 2013: 3,7; 5-letni IF: 3,9; MNiSW: 30, liczba cytowań: 15

2. Blasiak A*, Siwiec M, Grabowiecka A, Blasiak T, Czerw A, Blasiak E, Kania A, Rajfur Z, Lewandowski MH, Gundlach AL*. **Excitatory orexinergic innervation of rat nucleus incertus-Implications for ascending arousal, motivation and feeding control** (2015) Neuropharmacology 99:432-47. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.014.
   IF 2015: 4,9; 5-letni IF: 4,7; MNiSW: 40, liczba cytowań: 6

3. Kastman HE#, Blasiak A#, Walker L, Siwiec M, Krstew EV, Gundlach AL, Lawrence AJ. **Nucleus incertus orexin2 receptors mediate alcohol seeking in rats** (2016) Neuropharmacology 110:82-91. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.07.006 IF 4,9/40.
   IF 2015: 4,9; 5-letni IF: 4,7; MNiSW: 40, liczba cytowań: 2

4. Kania A, Gugula A, Grabowiecka A, de Ávila C, Blasiak T, Rajfur Z, Lewandowski MH, Hess G, Timofeeva E, Gundlach AL*, Blasiak A*. **Inhibition of oxytocin and vasopressin neuron activity in rat hypothalamic paraventricular nucleus by relaxin-3/RXFP3 signalling** (2017) Journal of Physiology 595:3425-3447. doi: 10.1113/JP273787.
   IF 2015: 4,7; 5-letni IF: 4,9; MNiSW: 40; liczba cytowań: 2

5. Blasiak A*, Gundlach AL, Hess G, Lewandowski MH. **Interactions of circadian rhythmicity, stress and orexigenic neuropeptide systems: implications for food intake control** (2017) Frontiers in Neuroscience 11: 127, doi: 10.3389/fnins.2017.00127.
   IF 2016: 3,6; MNiSW: 30; liczba cytowań: 0

* autor do korespondencji

równorzędny współautor

Sumarycznie:

IF (zgodnie z rokiem wydania) = **21,8**;

punkty MNiSW = **180**;

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

WSTĘP

Neuropeptydy to substancje białkowe, syntetyzowane i uwalniane przez komórki układu nerwowego w procesie neurosekrecji, które oddziałują na inne komórki, głównie neurony (Burbach, 2011). Miejsce powstawania danego rodzaju neuropeptydu może być ograniczone do pojedynczych rejonów mózgowia, jak w przypadku oreksyn występujących wyłącznie w bocznym podwzgórzu (Li et al., 2014) lub mogą być one syntetyzowane w wielu strukturach, często nie związanych ze sobą funkcjonalnie, jak w przypadku neuropeptydu Y (Adrian et al., 1983) czy relaksyny-3 (Smith et al., 2010). Neuropeptydy mogą pełnić funkcję neurotransmiterów (Brown, 1994), i w odróżnieniu od transmiterów będących pochodnymi aminokwasów, mogą oddziaływać nie tylko w sąsiedztwie miejsca ich uwalniania, ale także w znacznym oddaleniu od niego, modulując aktywność wielu komórek ośrodkowego układu nerwowego równocześnie. Charakterystyczną cechą układów neuropeptydów i ich receptorów, jest niespecyficzne unerwienie wielu obszarów mózgowia przez neurony je syntetyzujące, co dalej poszerza zakres ich oddziaływania. Istotną rolę neuropeptydów opisano między innymi w regulacji pobierania pokarmu oraz rytmiki okołodobowej, a jednym z nowoodkrytych i ważnych elementów na tym polu jest układ relaksyny-3 i jej receptorów.

Relaksyna-3 to neuropeptyd odkryty w roku 2002, przez zespół profesora Summersa z The Florey Institute of Neuroscience and Mental Health w Melbourne, Australia (Bathgate et al., 2002). Relaksyna-3 należy do nadrodziny peptydów insulinowych, zbudowana jest z dwóch łańcuchów peptydowych: A (24 aminokwasy) i B (27 aminokwasy) z trzema mostkami siarczkowymi w cząsteczce. Konserwatywna struktura relaksyny-3 wskazuje, że peptyd ten jest przodkiem rodziny peptydów relaksynowych, do której należy także relaksyna-1, - 2 oraz -4, oraz insulinopodobne peptydy 3-6 (Bathgate et al., 2013).

W odróżnieniu od pozostałych członków rodziny relaksyn, relaksyna-3 syntetyzowana jest przede wszystkim w mózgu. Znane są cztery obszary mózgowia, w których występuje ten neuropeptyd, szczególnie dokładnie opisane u myszy i szczura, są to: jądro niepewne (*nucleus incertus*, NI), gdzie występuje największa liczba neuronów syntetyzujących relaksynę-3, substancja szara okołowodociągowa (*periaqueductal gray*, PAG), mostowe jądro szwu (*pontine raphe nucleus*, PnR) oraz obszar położony nad substancją czarną (*area dorsal to substantia nigra*) (Ma et al., 2017).

Relaksyna-3 ma zdolność do aktywacji receptora rodziny peptydów relaksynowych 1 (*relaxin family peptide receptor 1* – RXFP1) oraz receptora rodziny peptydów relaksynowych 3 (*relaxin family*

peptide receptor 3 – RXFP3). Pozostałe receptory dla peptydów insulinowych (RXFP2 i RXFP4), występują przede wszystkich w tkankach obwodowych, między innymi w układzie rozrodczym i pokarmowym (Bathgate et al., 2013). Wszystkie receptory peptydów insulinowych należą do receptorów sprzężonych z białkami G (*G protein-coupled receptor* – GPCR).

Receptor RXFP1 sprzężony jest z białkiem Gs, a jego stymulacja prowadzi do wzrostu poziomu cAMP w komórce i decyduje o pobudzającym charakterze receptora, co potwierdzają nieliczne badania elektrofizjologiczne (Otsubo et al., 2010). Specyficznym ligandem tego receptora jest relaksyna-2. Relaksyna-3 również aktywuje receptor RXFP1, jednak ma do niego mniejsze powinowactwo niż relaksyna-2 (Bathgate et al., 2013).

Stymulacja receptora RXFP3 prowadzi, poprzez białko Gi/o, do spadku poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP oraz aktywacji szlaku kinaz regulowanych sygnałami zewnątrzkomórkowymi 1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2* – ERK1/2). Specyficznym natywnym ligandem receptora RXFP3 jest relaksyna-3, a selektywnym agonistą peptyd RXFP3-A2 (Bathgate et al., 2013).

Włókna neuronów syntetyzujących relaksynę-3 unerwiają wiele struktur mózgowia, w tym korę zakrętu obręczy, hipokamp, przegrodę, liczne jądra wzgórza, podwzgórza oraz rdzeń przedłużony (Olucha-Bordonau et al., 2012). Rozproszony charakter unerwienia relaksynergicznego oraz bogate unerwienie jądra niepewnego przez liczne, nie związane ze sobą funkcjonalnie ośrodki mózgowia sugeruje, że neuropeptyd jakim jest relaksyna-3, bierze udział w integracji bodźców zewnętrznych i wewnętrznych, by dostosować do nich zachowanie i stan fizjologiczny organizmu.

W obszarach mózgowia, w których opisano obecność włókien zawierających relaksynę-3, występują receptory aktywowane przez ten peptyd, choć od tej reguły istnieją wyjątki (Smith et al., 2010).

Badania przeprowadzone w ciągu ostatnich 15 lat, wykazały udział relaksyny-3 w regulacji wielu procesów fizjologicznych, takich jak: rytmika okołodobowa, regulacja snu i czuwania, zapamiętywanie, modulacja rytmu theta w hipokampie czy reakcja na stres. Relaksyna-3 moduluje także zachowania, w tym te związane z motywacją, jak pobieranie pokarmu czy poszukiwanie alkoholu (Ma et al., 2017). Najintensywniej badanym procesem, w którym rozpoznano udział relaksyny-3, jest pobieranie pokarmu, w szczególności pobieranie pokarmu indukowane stresem (Lenglos et al., 2013).

Relaksyna-3 to neuropeptyd działający silnie oreksygenicznie. Jego centralne podanie do komór mózgu lub lokalne, między innymi do jądra przykomorowego podwzgórza (*paraventricular nucleus*, PVN) oraz jądra nadwzrokowego (*supraoptic nucleus*, SON), prowadzi do wzmożonego pobierania pokarmu u sytych zwierząt (McGowan et al., 2005; 2007). Jednocześnie neurony jądra niepewnego syntetyzujące relaksynę-3 są wrażliwe na działanie różnego rodzaju stresorów, które powoduje ich aktywację i wzmożoną ekspresję peptydu (Tanaka et al., 2005). Właściwość ta, oraz

oreksygeniczny charakter relaksyny-3, stały się punktem wyjścia do badań nad udziałem relaksyny-3 w wywołanym stresem kompulsywnym pobieraniu pokarmu. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały znaczący udział układu relaksyna-3/receptory RXFP3 w indukcji tego zjawiska (Calvez et al., 2016). Jednak, mimo wzrastającej liczby doniesień o udziale relaksyny-3 w indukowanym stresem pobieraniu pokarmu, które prowadzi między innymi do nadwagi i otyłości, wiedza o neuronalnym mechanizmie leżącym u jego podstawy wciąż nie jest kompletna.

Spośród zachowań modulowanych przez relaksynę-3, a związanych z motywacją i wrażliwością na stres, wymienić należy poszukiwanie i spożywanie alkoholu oraz indukowany stresem nawrót tego zachowania. W 2013 roku, Ryan i współpracownicy wykazali, że podanie selektywnego antagonisty receptora RXFP3, substancji o nazwie R3(B1–22)R, do komór mózgu lub do jądra łożyskowego prążka krańcowego (*bed nucleus of the stria terminalis*, BNST), silnie osłabia motywację do pozyskania alkoholu przez preferujące alkohol szczury oraz osłabia indukowany stresem lub bodźcem nawrót poszukiwania alkoholu (Ryan et al., 2013). Wykazano również, że poziom mRNA dla relaksyny-3 w jądrze niepewnym pozytywnie skorelowany jest z ilością przyjmowanego alkoholu i sacharozy (Ryan et al., 2014). Podobnie jednak jak w przypadku pobierania pokarmu, neuronalny mechanizm związany z udziałem układu relaksyna-3/RXFP3 w przyjmowaniu alkoholu nie został poznany.

Wszelkie procesy fizjologiczne oraz zachowania, nie wyłączając tych związanych z motywacją, wykazują rytmikę okołodobową w swoim przebiegu i/lub występowaniu. Zaburzenie działania zegara biologicznego kontrolującego tę rytmikę, prowadzi do poważnych dysfunkcji w pracy całego organizmu. Nadrzędnym oscylatorem zegara biologicznego ssaków są jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza (*suprachiasmatic nuclei*, SCN), które pozostają pod wpływem wielu struktur mózgowia, spośród których za najważniejsze uważa się listek ciała kolankowatego bocznego wzgórza (*intergeniculate leaflet*, IGL) oraz przyśrodkowe jądra szwu (*median raphe nuclei*, MR) (Golombek i Rosenstein, 2010). Zarówno SCN, IGL jak i MR unerwiane są przez włókna zawierające relaksynę-3, a wpływ układu relaksyna-3/receptory RXFP3 na rytmikę procesów fizjologicznych, został opisany przede wszystkim u myszy pozbawionych genu kodującego zarówno sam neuropeptyd, jak i receptor RXFP3. Wykazano między innymi, że myszy z nokautem genu relaksyny-3 lub receptora RXFP3, charakteryzują się obniżoną aktywnością lokomotoryczną podczas fazy ciemnej cyklu dobowego (Hosken et al., 2015; Smith et al., 2012), a dokomorowe podanie selektywnego antagonisty receptora RXFP3, redukuje aktywność związaną z oczekiwaniem na posiłek (*food anticipatory activity*, FAA) (Smith et al., 2014). Warto wspomnieć, że pośród wymienionych struktur mózgowia budujących zegar biologiczny ssaków, listek ciała kolankowatego pełni istotną rolę w dostosowaniu rymów lokomotoryki i temperatury do warunków ograniczonej (czasowo i ilościowo) dostępności pokarmu (Challet et al., 1996).

Podstawowym celem badań przedstawionych w monotematycznym cyklu prac, wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, było zbadanie neuronalnego mechanizmu leżącego u podłoża: i/ interakcji układu relaksynergicznego z układem oreksynergicznym, ii/ oddziaływania relaksyny-3 na struktury zegara biologicznego, oraz iii/ oreksynergicznego działania relaksyny-3.

Omówienie wyników prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego:

1. Blasiak A, Blasiak T, Lewandowski MH, Hossain MA, Wade JD, Gundlach AL. **Relaxin-3 innervation of the intergeniculate leaflet of the rat thalamus - neuronal tract-tracing and *in vitro* electrophysiological studies** (2013) European Journal of Neuroscience 37:1284-94.

Listek ciała kolankowatego bocznego wzgórza (IGL) to struktura, której rola związana jest przede wszystkim z regulacją rytmiki okołodobowej ssaków, poprzez przesyłanie zintegrowanych informacji świetlnych i nieświetlnych do głównego generatora rytmów biologicznych – jąder nadskrzyżowaniowych (SCN) (Morin & Allen, 2006). Ponadto, dane neuroanatomiczne wskazują na udział IGL w regulacji cyklu sen-czuwanie oraz koordynacji wzrokowo-ruchowej (Morin and Blanchard, 2005). IGL unerwiany jest przez wiele struktur mózgowia, w tym zarówno jądra budujące układy niespecyficzne, jak i elementy dróg specyficznych. Na obszarze IGL stwierdzono obecność włókien zawierających relaksynę-3, a gęstość unerwienia relaksynergicznego w IGL jest największa spośród wszystkich struktur wzgórza (Tanaka et al., 2005).

W omawianej pracy, dzięki zastosowaniu techniki wstecznego znakowania szlaków neuronalnych, dowiedziono że źródłem unerwienia relaksynergicznego IGL szczura jest substancja szara okołowodociągowa (PAG), drugi co do liczby neuronów syntetyzujących relaksynę-3 ośrodek mózgowia. Dzięki porównaniu liczby wszystkich neuronów PAG syntetyzujących relaksynę-3, z liczbą neuronów, które wypełnione były barwnikiem wstecznym, wykazano, że około 25% wszystkich komórek PAG produkujących relaksynę-3 unerwia pojedynczy IGL. Ponadto scharakteryzowano unerwienie relaksynergiczne IGL jako nie wykazujące lateralizacji. Pozostałe źródła relaksyny-3 w mózgowiu, okazały się nie mieć istotnego udziału w unerwieniu IGL. W przypadku tylko 1% neuronów syntetyzujących relaksynę-3, umiejscowionych w jądrze niepewnym i mostowych jądrach szwu, stwierdzono obecność wstecznego barwnika pobranego z obszaru IGL. Nie zaobserwowano wstecznie wybarwionych neuronów w obszarze położonym grzbietowo do substancji czarnej. Dzięki zastosowaniu techniki barwień immunohistochemicznych, stwierdzono obecności receptorów dla kortykoliberyny na relaksynergicznych neuronach PAG unerwiających IGL.

Po raz pierwszy, dzięki rejestracji aktywności elektrycznej komórek metodą patch clamp w konfiguracji whole-cell, zbadano reakcję neuronów na aktywację receptora RXFP3. W przypadku

neuronów IGL stwierdzono, że ekspozycja na selektywnego agonistę receptorów RXFP3, substancję o nazwie R3/I5 (100nM), w standardowym sztucznym płynie mózgowo rdzeniowym (*artificial cerebrospinal fluid*, ACSF), w większości przypadków (78% badanych neuronów), powoduje spadek częstotliwości spontanicznie generowanych potencjałów czynnościowych. Co ciekawe, część neuronów IGL (18%) zareagowała wzrostem częstotliwości generowanych potencjałów czynnościowych, czyli pobudzeniem. Ponadto stwierdzono, że aktywacja receptora RXFP3 w obecności tetrodotoksyny (TTX) w ACSF, czyli w warunkach odizolowania od wpływów będących skutkiem generowania potencjałów czynnościowych powstających z udziałem napięciowzależnych kanałów sodowych, również wywołuje hiperpolaryzację (53% badanych neuronów) lub depolaryzację (29% badanych neuronów). Istotną obserwacją, poczynioną dzięki zastosowaniu barwień immunohistochemicznych na tkance badanej wcześniej metodami elektrofizjologicznymi, było stwierdzenie, że wszystkie neurony IGL, które syntetyzowały neuropeptyd Y (*neuropeptide Y*, NPY) i były wrażliwe na aktywację receptora RXFP3, odpowiadały depolaryzacją na obecność R3/I5 w ACSF. W mózgu szczura, neurony IGL syntetyzujące NPY bezpośrednio unerwiają SCN i stanowią główny element neuronalnego mechanizmu związanego z przekazywaniem zintegrowanych informacji świetlnych i nieświetlnych z IGL do SCN.

Podsumowując, w omówionej pracy zidentyfikowano substancję szarą okołowodociągową, jako źródło unerwiania relaksynergicznego listka ciała kolankowatego bocznego. Ponadto wykazano, że neurony syntetyzujące relaksynę-3 i unerwiające listek ciała kolankowatego bocznego, posiadają receptory dla kortykoliberyny, co wskazuje na ich potencjalną funkcję w przekazywaniu informacji związanej ze stresem, poprzez listek do głównego generatora rytmów biologicznych – jąder nadskrzyżowaniowych. Po raz pierwszy opisano elektrofizjologiczną reakcję neuronów na aktywację receptorów RXFP3 i wskazano, że zależy ona od charakterystyki neurochemicznej komórek.

2. Blasiak A, Siwiec M, Grabowiecka A, Blasiak T, Czerw A, Blasiak E, Kania A, Rajfur Z, Lewandowski MH, Gundlach AL. **Excitatory orexinergic innervation of rat nucleus incertus-Implications for ascending arousal, motivation and feeding control** (2015) Neuropharmacology 99:432-47.

Na obszarze jądra niepewnego znajdują się zakończenia aksonalne neuronów bocznego podwzgórza (Ma & Gundlach, 2015), gdzie syntetyzowane są między innymi neuropeptydy oreksyny (hipokretyny). Oreksyny (A i B), podobnie jak w przypadku relaksyny-3, syntetyzowane są przez neurony unerwiające wiele ośrodków mózgowia, tworząc dyfuzyjny układ niespecyficzny, wpływający na szereg zachowań i procesów fizjologicznych organizmu. Ostatnie dwie dekady badań dały podstawy do uznania układu

oreksynergicznego za kluczowy dla właściwego utrzymania wzbudzenia organizmu i przebiegu metabolizmu, a wiele doniesień wskazuje na nadrzędną rolę tego układu w kontroli takich zjawisk jak: cykl sen-czuwanie, związane z nagrodą pobieranie pokarmu, procesy związane z motywacją, zapamiętywanie i inne (Li et al., 2014).

Udział układu relaksyny-3 i jej receptorów w regulacji pobierania pokarmu i wzbudzenia organizmu, procesów kontrolowanych przez oreksyny, stał się punktem wyjścia badań nad wpływem oreksyn na aktywność neuronów jądra niepewnego.

W przedstawionej pracy wykazano, że jądro niepewne unerwione jest przez około 21% neuronów syntetyzujących oreksynę. Co ważne, nie stwierdzono zróżnicowania w rozmieszczeniu tych neuronów na obszarze bocznego podwzgórza. Ponieważ istnieje hipoteza, mówiąca o zaangażowaniu populacji neuronów oreksynowych bocznego podwzgórza w kontrolę procesów związanych z motywacją/nagrodą, a przyśrodkowego podwzgórza w procesy związane ze wzbudzeniem/stresem (przyśrodkowe podwzgórze) (Harris and Aston-Jones, 2006), unerwienie NI przez obie populacje neuronów oreksynowych może świadczyć o tym, że struktura ta znajduje się pod wpływem informacji związanej z oboma rodzajami w/w procesów.

Mapowanie włókien zawierających oreksynę na obszarze NI pozwoliło stwierdzić, że zakończenia aksonalne komórek oreksynowych unerwiają wszystkie części tego jądra, w całej osi przednio-tylnej. Zaobserwowano, że włókna zawierające oreksynę znajdują się zarówno w części zbitej (*pars compacta*), jak i rozproszonej (*pars dissipata*) NI. Ponadto wykazano, że zakończenia aksonalne neuronów oreksynowych tworzą połączenia synaptyczne z neuronami NI syntetyzującymi relaksynę-3.

Pierwsze przeprowadzone na neuronach jądra NI doświadczenia elektrofizjologiczne, dowiodły, że większość komórek NI jest czuła na oreksynę A, a niemal połowa z nich to neurony syntetyzujące relaksynę-3. Wykazano, że wrażliwość na oreksynę A zostaje zachowana w obecności TTX, co dowodzi bezpośredniego wpływu układu oreksynergicznego na neurony NI, w tym te syntetyzujące relaksynę-3.

W toku przeprowadzonych doświadczeń dokonano charakterystyki elektrofizjologicznej neuronów NI. Wyróżniono dwa typy komórek nerwowych tej struktury: typ I, charakteryzujący się obecnością kanałów potasowych typu A oraz typ II charakteryzujący się obecnością napięciowo-zależnych kanałów wapniowych. Wykazano, że w przypadku neuronów typu I, do którego należały wszystkie zidentyfikowane komórki relaksynowe, aktywacja receptorów oreksynowych prowadzi do otwarcia napięciowo-zależnych kanałów wapniowych typu L, natomiast w przypadku neuronów typu II do aktywacji wymiennika sodowo-wapniowego.

W toku przeprowadzonych doświadczeń nie stwierdzono wpływu oreksyny A na kształt potencjałów czynnościowych generowanych przez neurony NI, co wskazało między innymi na brak

wpływu oreksyny na przewodnictwo potasowe związane z kształtowaniem potencjałów czynnościowych.

Oreksyny oddziałują na komórki nerwowe poprzez dwa typy receptorów: typ 1 (OX_1) oraz typ 2 (OX_2). W oddzielnym bloku eksperymentów, przeprowadzonym dzięki kombinacji rejestracji aktywności elektrofizjologicznej w trybie whole-cell i reakcji łańcuchowej polimerazy na materiale pochodzącym z pojedynczych komórek nerwowych (*single cell polymerase chain reaction*, scPCR), stwierdzono, że neurony NI czułe na oreksynę A, wykazują przede wszystkim ekspresję mRNA receptora OX_2. Zgodnie z przewidywaniami, nie zaobserwowano obecności mRNA dla żadnego z dwóch typów receptorów oreksynowych, w neuronach NI, które podczas wcześniejszych badań elektrofizjologicznych były niewrażliwe na oreksynę A. Wyniki badań scPCR potwierdzone zostały wynikami barwień immunohistochemicznych, w których wykazano obecność białka receptora OX_2 na neuronach NI.

Podsumowując, w przedstawionej pracy po raz pierwszy scharakteryzowano elektrofizjologiczne typy neuronów jądra niepewnego oraz opisano silny wpływ oreksyny A na aktywność poszczególnych typów, w tym neuronów syntetyzujących relaksynę-3. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalne zaangażowanie układu relaksyny-3 i jej receptorów, w procesy pozostające pod kontrolą układu oreksynergicznego, do których należy między innymi kontrola wzbudzenia, odpowiedź na stres oraz zachowania związane z motywacją.

3. Kastman HE, Blasiak A, Walker L, Siwiec M, Krstew EV, Gundlach AL, Lawrence AJ. **Nucleus incertus orexin2 receptors mediate alcohol seeking in rats** (2016) Neuropharmacology 110:82-91.

Nadużywanie substancji uzależniających to czynnik ryzyka wystąpienia wielu chorób i urazów. Samo nadużywanie alkoholu uznane zostało za przyczynę około 6% zgonów rocznie (dotyczy całej populacji ludzkiej, WHO, 2015). Czynnikiem odgrywającym istotną rolę w rozwoju uzależnienia od alkoholu oraz nawrocie do nałogu jest stres (Jupp and Lawrence, 2010). Wykazano, że w neuronalnym mechanizmie leżącym u podłoża rozwoju uzależnienia od alkoholu, istotną rolę odgrywa układ oreksynergiczny i relaksynergiczny. Wiadomo, że domózgowe podanie antagonistów receptorów oreksynowych prowadzi do redukcji spożycia alkoholu, a samo poszukiwanie alkoholu nieodłącznie związane jest z aktywacją neuronów oreksynowych (Kim et al., 2012). Jak wcześniej opisano, układ oreksynergiczny oddziałuje na neurony syntetyzujące relaksynę-3 w jądrze niepewnym, a układ relaksyny-3 i jej receptorów zaangażowany jest w regulację konsumpcji alkoholu, w tym konsumpcję indukowaną stresem oraz nawrót poszukiwania alkoholu (Ryan et al., 2013; Walker et al., 2015).

W omawianej pracy udokumentowano brak wpływu spożytego alkoholu na liczbę neuronów syntetyzujących oreksynę w podwzgórzu. Ponadto dowiedziono, że indukowany podaniami johimbiny, stresora farmakologicznego, nawrót warunkowanego instrumentalnie spożywania alkoholu, wywołuje aktywację neuronów oreksynowych. Opisana aktywacja nie zależała od rejonu podwzgórza, w którym neurony te się znajdowały; podobną liczbę zaktywowanych neuronów oreksynowych zaobserwowano w rejonie brzuszno-przyśrodkowym, bocznym oraz około-sklepieniowym podwzgórza.

Stwierdzono, że w indukowanym stresem nawrocie poszukiwania alkoholu, biorą udział receptory OX_2 znajdujące się na neuronach NI, ponieważ podanie do NI selektywnego antagonisty tych receptorów - TCS-0X2-29, istotnie osłabiało opisane zachowanie. Dowiedziono również, że w nawrocie poszukiwania alkoholu nie biorą udziału receptory OX_1 w NI, ponieważ podanie do tej struktury ich selektywnego antagonisty - SB-334867, nie wpływało na wywołany nawrót.

Wyniki badań behawioralnych zostały potwierdzane wynikami eksperymentów elektrofizjologicznych, przeprowadzonych w warunkach *in vitro*, na skrawkach mózgu zawierających NI. Zaobserwowano, że w neuronach NI depolaryzacja i wzrost częstotliwości generowanych potencjałów czynnościowych wywołane podaniem oreksyny A, substancji mającej podobne powinowactwo do obu typów receptorów oreksynowych, nie zostają zmienione w obecności antagonisty receptorów OX_1 – SB-334867. Eksperymenty z użyciem antagonisty receptorów OX_2 – TCS-0X2-29, potwierdziły kluczowy udział tych receptorów w wywołanym oreksyną pobudzeniu neuronów NI, w tym neuronów syntetyzujących relaksynę-3, ponieważ blokada receptorów OX_2 znosiła obserwowany efekt oreksyny A.

Podsumowując, w przedstawionej pracy po raz pierwszy dowiedziono, że indukowanemu stresem nawrotowi poszukiwania alkoholu, towarzyszy pobudzenie neuronów syntetyzujących oreksyny. Ponadto wykazano, że aktywacja receptorów oreksynowych typu 2 w jądrze niepewnym, jest istotnym elementem neuronalnego mechanizmu leżącego u podłoża związanego za stresem poszukiwania alkoholu w fazie nawrotu.

4. Kania A, Gugula A, Grabowiecka A, de Ávila C, Blasiak T, Rajfur Z, Lewandowski MH, Hess G, Timofeeva E, Gundlach AL, Blasiak A. **Inhibition of oxytocin and vasopressin neuron activity in rat hypothalamic paraventricular nucleus by relaxin-3/RXFP3 signalling (2017)** Journal of Physiology 595:3425-3447.

Układ relaksyny-3 i jej receptorów silnie związany jest z pobieraniem pokarmu, także tym indukowanym stresem (Calvez et al., 2016). Dzięki wynikom badań różnych grup badawczych wiadomo, że istotną rolę w oreksygenicznym działaniu relaksyny-3 odgrywa jądro przykomorowe

podwzgórza (PVN) (Calvez et al., 2015; McGowan et al., 2005). W szczególności badania, w których po lokalnym, ostrym lub chronicznym, podaniu relaksyny-3 do PVN, obserwowano wzrost ilości spożytego pokarmu przez zwierzęta poddane doświadczeniu oraz podobny efekt eksperymentów z indukowanym wirusami, chronicznym uwalnianiem selektywnego agonisty receptorów RXFP3 do PVN, umocniły znaczenie tego jądra w neuronalnym mechanizmie oreksygenicznego działania relaksyny-3 (Ganella et al., 2013). Jednak szczegóły mechanizmu działania relaksyny-3 w samym PVN nie zostały opisane. Podobnie, nieznany pozostał rodzaj neuronów posiadających receptory RXFP3 w PVN oraz charakter ich reakcji zarówno na relaksynę-3, jak i selektywną aktywację receptorów RXFP3.

W zaprezentowanej pracy badano wpływ neuropeptydu relaksyny-3 oraz selektywnej aktywacji receptorów RXFP3 na neurony wielkokomórkowe, syntetyzujące oksytocynę (*oxytocin*, OT) lub wazopresynę (*arginine vasopressin*, AVP) oraz neurony drobnokomórkowe PVN. Wykazano, że 82% neuronów wielkokomórkowych PVN jest czułych na selektywnego agonistę receptorów RXFP3, substancję o nazwie RXFP3-A2. Aktywacja receptorów RXFP3 na neuronach wielkokomórkowych PVN w standardowym ACSF, prowadziła do spadku częstotliwości generowanych przez te komórki potencjałów czynnościowych oraz/lub do ich hiperpolaryzacji. Specyfika działania agonisty została potwierdzona wynikami eksperymentów, w których pokazano, że jego hamujące działanie zostaje zniesione w obecności specyficznego antagonisty receptorów RXFP3 - R3 B1-22R. Zaobserwowano, że hamujące działanie agonisty zostaje utrzymane w obecności TTX i antagonistów jonotropowych receptorów GABAergicznych i glutaminergicznych, co wskazało na umiejscowienie receptorów RXFP3 bezpośrednio na neuronach wielkokomórkowych PVN.

Na podstawie opisanych w pracy wyników eksperymentów elektrofizjologicznych, przeprowadzonych przy użyciu mikropipet wypełnionych inhibitorem białek Gαi/o – toksyną krztuśca (*pertussis toxin*, PTX), które pokazały blokujący wpływ toksyny na wrażliwość neuronów PVN na RXFP3-A2 stwierdzono, że w wewnątrzkomórkowej kaskadzie sygnału aktywowanej przez receptory RXFP3, biorą udział białka Gαi/o.

Neurony, które uległy hiperpolaryzacji w wyniku ekspozycji na RXFP3-A2, poddane zostały ponownemu działaniu agonisty w obecności chlorku kadmu ($CdCl_2$), który blokuje napięciowo-zależne kanały wapniowe. Zaobserwowano, że w obecności $CdCl_2$, indukowany agonistą w warunkach kontrolnych odkomórkowy prąd prostowniczy, nie jest aktywowany. Pozwoliło to stwierdzić, że prawdopodobnym mechanizmem jonowym, aktywowanym przez receptory RXFP3 jest scharakteryzowany wcześniej w neuronach PVN, zależny od wapnia, prostowniczy odkomórkowy prąd potasowy.

Po raz pierwszy, w osobnym bloku eksperymentów, zarejestrowano elektrofizjologiczną reakcję neuronów na natywną relaksynę-3. Wykazano, że podobnie jak w przypadku RXFP3-A2, neurony wielkokomórkowe PVN są bardzo czułe na relaksynę-3; w 92% badanych neuronów,

po podaniu neuropeptydu zaobserwowano spadek częstotliwości generowanych potencjałów czynnościowych lub/i ich hiperpolaryzację. Podobne, hamujące działanie relaksyny-3, obserwowano podczas rejestracji przeprowadzonych w obecności TTX oraz antagonistów jonotropowych receptorów GABAergicznych i glutaminergicznych. Wyniki tej części badań pozwoliły na stwierdzenie, że relaksyna-3 działa bezpośrednio na neurony wielkokomórkowe PVN. Relaksyna-3 może aktywować zarówno receptory RXFP1, jak i RXFP3. W przypadku komórek PVN dowiedziono, że natywny neuropeptyd wywołuje swój efekt poprzez receptory RXFP3, ponieważ ich blokada specyficznym antagonistą - R3 B1-22R, powodowała zniesienie hamowania wywołanego relaksyną-3.

Dzięki barwieniom immunohistochemicznym przeprowadzonym po rejestracjach elektrofizjologicznych z użyciem RXFP3-A2 i relaksyny-3, stwierdzono, że neurony wielkokomórkowe PVN wrażliwe na obie substancje, są neuronami syntetyzującymi OT i AVP.

W omawianej pracy dowiedziono również, że neurony drobnokomórkowe PVN, które mogą syntetyzować OT, AVP, kortykoliberynę czy tyreoliberynę, pozostają czułe na aktywację receptorów RXFP3. Wykazano, że aktywność elektryczna około 40% neuronów drobnokomórkowych PVN, podobnie jak w przypadku neuronów wielkokomórkowych, zostaje wyhamowana pod wpływem agonisty RXFP3-A2, co przejawiało się spadkiem częstotliwości generowania potencjałów czynnościowych i/lub hiperpolaryzacją ich błony.

Dodatkowo, dzięki użyciu techniki hybrydyzacji *in situ*, wykazano, że w 91-100% neuronów PVN syntetyzujących OT i AVP, obecny jest mRNA dla receptorów RXFP3.

W pracy opisano źródło unerwienia relaksynergicznego PVN, wskazując, że jest nim NI. Jednak wyniki barwień immunohistochemicznych PVN i okolic tej struktury pokazały, że na obszarze samego PVN znajdują się tylko nieliczne włókna zawierające relaksynę-3. W przeciwieństwie do samego PVN, okolice jądra były bogato unerwione przez włókna relaksynergiczne, które były aksonami neuronów NI. Może to świadczyć o tym, że relaksyna-3 dociera do neuronów PVN na drodze transmisji objętościowej, charakterystycznej dla wielu neuropeptydów (van den Pol, 2012).

Podsumowując, w omówionej pracy, po raz pierwszy opisano wpływ relaksyny-3 na elektrofizjologię komórek nerwowych i stwierdzono, że zarówno relaksyna-3, jak i selektywny agonista receptorów RXFP3 hamują aktywność neuronów PVN. Opisano mechanizm jonowy tego zjawiska, oraz scharakteryzowano unerwienie PVN przez włókna zawierające relaksynę-3. Opisany neuronalny mechanizm działania relaksyny-3 w PVN, może być podłożem oreksynergicznego działania tego neuropeptydu. Wyhamowanie aktywności neuronów wielkokomórkowych PVN przez relaksynę-3, a w konsekwencji spadek wydzielania anoreksygenicznych peptydów, jakimi są OT i AVP, prowadzić może do wzrostu pobierania pokarmu.

Dodatkowo, znaczenie przedstawionych wyników i opisanego neuronalnego mechanizmu działania relaksyny-3 w PVN, zostało podsumowane w artykule *„The Relaxin-3/RXFP3 system as a peptidergic pathway to control hypothalamic neurons"*, który ukazał się w The Journal of Physiology (perspective article, Landry, 2017).

5. Blasiak A, Gundlach AL, Hess G, Lewandowski MH. **Interactions of circadian rhythmicity, stress and orexigenic neuropeptide systems: implications for food intake control** (2017) Frontiers in Neuroscience 11: 127.

W przedstawionej pracy przeglądowej opisano powszechność rytmiki okołodobowej i jej znaczenie w procesach związanych z wydzielaniem hormonów, neuropeptydów i neurotransmiterów. Podkreślono wzajemną interakcję pomiędzy zmieniającym się w rytmie dobowym poziomem różnych mediatorów, a strukturami mózgowia tworzącymi zegar biologiczny, w tym z nadrzędnym generatorem rytmów okołodobowych, jakim są jądra nadskrzyżowaniowe (SCN). Szczególną uwagę zwrócono na fakt, że zaburzenia rytmiki w wydzielaniu hormonów/przekaźników oraz wrażliwości ich receptorów, mogą prowadzić do rozwoju wielu chorób metabolicznych i psychicznych, w tym otyłości i anomalii związanych z pobieraniem pokarmu.

Niezwykle istotną rolę w rozwoju zaburzeń rytmiki okołodobowej, i nierozerwalnie z nimi związanego rozregulowania metabolizmu organizmu, ma wzajemna funkcjonalna zależność osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (*hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA) oraz struktur budujących zegar biologiczny ssaków. W pracy scharakteryzowano fizjologiczne, dobowe zmiany w poziomie transmiterów osi HPA oraz zaburzenia tej rytmiki wywołane chroniczny stresem, nadmierną ekspozycją na sztuczne oświetlenie, dezorganizacją naturalnego cyklu snu i czuwania – czynnikami, na które szczególnie narażeni są mieszkańcy wysokorozwiniętych społeczeństw.

Pobieranie pokarmu jest kluczowym dla przeżycia zachowaniem związanym z motywacją (Geiselman, 1996). Zarówno pobieranie pokarmu, apetyt, jak i metabolizm, regulowane są przez szereg układów neuroprzekaźników i neurohormonów, które mogą działać oreksygenicznie lub anoreksygenicznie. W omawianej pracy scharakteryzowano oreksygeniczne neuropeptydy; białko agouti, neuropeptyd Y, oreksyny, hormon koncentrujący melaninę oraz relaksynę-3. Opisano fundamentalne znaczenie wymienionych transmiterów w procesie pobierania pokarmu, wrażliwość neuronów je syntetyzujących na różnego rodzaju stresory oraz na zaburzania w funkcjonowaniu struktur mózgowia budujących zegar biologiczny ssaków. Ponadto, przytoczono dane literaturowe wskazujące na zależność pracy struktur zegara biologicznego od właściwego poziomu białek regulujących pobieranie pokarmu.

Podsumowując, w przedstawionej pracy wskazano silne, wzajemne strukturalne i funkcjonalne powiązanie między ośrodkami mózgowia budującymi zegar biologiczny, wybranymi transmiterami regulującymi pobieranie pokarmu, a stresem. Ponadto, udokumentowano wpływ zaburzeń tych interakcji na rozwój otyłości, zaburzeń odżywiania i metabolizmu, wskazując tym samym na potrzebę holistycznego podejścia do badań związanych z wpływem stresu na różne aspekty funkcjonowania organizmu.

Opisane w przedstawionym cyklu prac osiągnięcia, w tym przede wszystkim scharakteryzowanie mechanizmu neuronalnego leżącego u podłoża bezpośrednich oddziaływań układu relaksyny-3 i jej receptorów z: i/ ośrodkami kontrolującymi stan wzbudzenia organizmu i motywację, ii/ strukturami zegara biologicznego oraz iii/ strukturami związanym z regulacją metabolizmu i pobierania pokarmu, nie tylko uzupełniają aktualny stan wiedzy o układzie relaksynergicznym, ale także, mogą się przyczynić do opracowania nowych terapii w leczeniu zaburzeń odżywiania i alkoholizmu.

Bibliografia:

Adrian, T.E., Allen, J.M., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Rossor, M.N., Roberts, G.W., Crow, T.J., Tatemoto, K., Polak, J.M., n.d. Neuropeptide Y distribution in human brain. Nature 306, 584–6.

Bathgate, R.A.D., Samuel, C.S., Burazin, T.C.D., Layfield, S., Claasz, A.A., Reytomas, I.G.T., Dawson, N.F., Zhao, C., Bond, C., Summers, R.J., Parry, L.J., Wade, J.D., Tregear, G.W., 2002. Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene: Novel members of the relaxin peptide family. J. Biol. Chem. 277, 1148–1157. doi:10.1074/jbc.M107882200

Bathgate, R. a D., Halls, M.L., van der Westhuizen, E.T., Callander, G.E., Kocan, M., Summers, R.J., 2013. Relaxin family peptides and their receptors. Physiol. Rev. 93, 405–80. doi:10.1152/physrev.00001.2012

Brown, R.E., 1994. An introduction to neuroendocrinology. Cambridge University Press.

Burbach, J.P.H., 2011. What Are Neuropeptides?, in: Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). pp. 1–36. doi:10.1007/978-1-61779-310-3_1

Calvez, J., De Ávila, C., Matte, L.O., Guèvremont, G., Gundlach, A.L., Timofeeva, E., 2016. Role of relaxin-3/RXFP3 system in stress-induced binge-like eating in female rats. Neuropharmacology 102, 207–215. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.11.014

Calvez, J., Lenglos, C., de Ávila, C., Guèvremont, G., Timofeeva, E., 2015. Differential effects of central administration of relaxin-3 on food intake and hypothalamic neuropeptides in male and female rats. Genes, Brain Behav. 14, 550–563. doi:10.1111/gbb.12236

Challet, E., Pévet, P., Malan, A., 1996. Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed during daytime. Neurosci. Lett. 216, 214–8.

Ganella, D.E., Callander, G.E., Ma, S., Bye, C.R., Gundlach, a L., Bathgate, R. a D., 2013. Modulation of feeding by chronic rAAV expression of a relaxin-3 peptide agonist in rat hypothalamus. Gene Ther. 20, 703–16. doi:10.1038/gt.2012.83

Geiselman, P.J., 1996. Control of food intake. A physiologically complex, motivated behavioral system. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 25, 815–29.

Golombek, D.A., Rosenstein, R.E., 2010. Physiology of Circadian Entrainment. Physiol. Rev. 90.

Harris, G.C., Aston-Jones, G., 2006. Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. Trends Neurosci. 29, 571–577. doi:10.1016/j.tins.2006.08.002

Hosken, I.T., Sutton, S.W., Smith, C.M., Gundlach, A.L., 2015. Relaxin-3 receptor (Rxfp3) gene knockout mice display reduced running wheel activity: Implications for role of relaxin-3/RXFP3 signalling in sustained arousal. Behav. Brain Res. 278, 167–175. doi:10.1016/j.bbr.2014.09.028

Jupp, B., Lawrence, A.J., 2010. New horizons for therapeutics in drug and alcohol abuse. Pharmacol. Ther. 125, 138–168. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.11.002

Kim, A.K., Brown, R.M., Lawrence, A.J., 2012. The role of orexins/hypocretins in alcohol use and abuse:

an appetitive-reward relationship. Front. Behav. Neurosci. 6, 78. doi:10.3389/fnbeh.2012.00078

Landry, M., 2017. The relaxin-3/RXFP3 system as a peptidergic pathway to control hypothalamic neurons. J. Physiol. 595, 3249–3250. doi:10.1113/JP274052

Lenglos, C., Mitra, A., Guèvremont, G., Timofeeva, E., 2013. Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats. Genes, Brain Behav. 12, 370–387. doi:10.1111/gbb.12028

Li, J., Hu, Z., De Lecea, L., 2014. The hypocretins/orexins: Integrators of multiple physiological functions. Br. J. Pharmacol. 171, 332–350. doi:10.1111/bph.12415

Ma, S., Gundlach, A.L., 2015. Ascending Control of Arousal and Motivation: Role of Nucleus Incertus and its Peptide Neuromodulators in Behavioural Responses to Stress. J. Neuroendocrinol. 27, 457–467. doi:10.1111/jne.12259

Ma, S., Smith, C.M., Blasiak, A., Gundlach, A.L., 2017. Distribution, physiology and pharmacology of relaxin-3/RXFP3 systems in brain. Br. J. Pharmacol. 174, 1034–1048. doi:10.1111/bph.13659

McGowan, B.M., Stanley, S. a, White, N.E., Spangeus, a, Patterson, M., Thompson, E.L., Smith, K.L., Donovan, J., Gardiner, J. V, Ghatei, M. a, Bloom, S.R., 2007. Hypothalamic mapping of orexigenic action and Fos-like immunoreactivity following relaxin-3 administration in male Wistar rats. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 292, E913–E919. doi:10.1152/ajpendo.00346.2006

McGowan, B.M.C., Stanley, S.A., Smith, K.L., White, N.E., Connolly, M.M., Thompson, E.L., Gardiner, J. V., Murphy, K.G., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2005. Central relaxin-3 administration causes hyperphagia in male wistar rats. Endocrinology 146, 3295–3300. doi:10.1210/en.2004-1532

Morin, L.P., Allen, C.N., 2006. The circadian visual system, 2005. Brain Res. Rev. 51, 1–60. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.08.003

Morin, L.P., Blanchard, J.H., 2005. Descending projections of the hamster intergeniculate leaflet: Relationship to the sleep/arousal and visuomotor systems. J. Comp. Neurol. 487, 204–216. doi:10.1002/cne.20546

Olucha-Bordonau, F.E., Otero-García, M., Sánchez-Pérez, A.M., Núñez, Á., Ma, S., Gundlach, A.L., 2012. Distribution and targets of the relaxin-3 innervation of the septal area in the rat. J. Comp. Neurol. 520, 1903–1939. doi:10.1002/cne.23018

Otsubo, H., Onaka, T., Suzuki, H., Katoh, A., Ohbuchi, T., Todoroki, M., Kobayashi, M., Fujihara, H., Yokoyama, T., Matsumoto, T., Ueta, Y., 2010. Centrally administered relaxin-3 induces Fos expression in the osmosensitive areas in rat brain and facilitates water intake. Peptides 31, 1124–1130. doi:10.1016/j.peptides.2010.02.020

Ryan, P.J., Kastman, H.E., Krstew, E. V, Rosengren, K.J., Hossain, M.A., Churilov, L., Wade, J.D., Gundlach, A.L., Lawrence, A.J., 2013. Relaxin-3/RXFP3 system regulates alcohol-seeking. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 20789–20794. doi:10.1073/pnas.1317807110

Ryan, P.J., Krstew, E. V., Sarwar, M., Gundlach, A.L., Lawrence, A.J., 2014. Relaxin-3 mRNA levels in nucleus incertus correlate with alcohol and sucrose intake in rats. Drug Alcohol Depend. 140, 8–16. doi:10.1016/j.drugalcdep.2014.04.017

Smith, C.M., Chua, B.E., Zhang, C., Walker, A.W., Haidar, M., Hawkes, D., Shabanpoor, F., Hossain, M.A., Wade, J.D., Rosengren, K.J., Gundlach, A.L., 2014. Central injection of relaxin-3 receptor (RXFP3) antagonist peptides reduces motivated food seeking and consumption in C57BL/6J mice. Behav. Brain Res. 268, 117–126. doi:10.1016/j.bbr.2014.03.037

Smith, C.M., Hosken, I.T., Sutton, S.W., Lawrence, A.J., Gundlach, A.L., 2012. Relaxin-3 null mutation mice display a circadian hypoactivity phenotype. Genes, Brain Behav. 11, 94–104. doi:10.1111/j.1601-183X.2011.00730.x

Smith, C.M., Shen, P.J., Banerjee, A., Bonaventure, P., Ma, S., Bathgate, R.A.D., Sutton, S.W., Gundlach, A.L., 2010. Distribution of relaxin-3 and RXFP3 within arousal, stress, affective, and cognitive circuits of mouse brain. J. Comp. Neurol. 518, 4016–4045. doi:10.1002/cne.22442

Tanaka, M., Iijima, N., Miyamoto, Y., Fukusumi, S., Itoh, Y., Ozawa, H., Ibata, Y., 2005. Neurons expressing relaxin 3/INSL 7 in the nucleus incertus respond to stress. Eur. J. Neurosci. 21, 1659–1670. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03980.x

van den Pol, A.N., 2012. Neuropeptide Transmission in Brain Circuits. Neuron 76, 98–115. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.014

Walker, A.W., Smith, C.M., Chua, B.E., Krstew, E. V, Zhang, C., Gundlach, A.L., Lawrence, A.J., 2015. Relaxin-3 receptor (RXFP3) signalling mediates stress-related alcohol preference in mice. PLoS One 10, e0122504. doi:10.1371/journal.pone.0122504

WHO, World Health Organization 2015, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/en/

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

W roku 1997 podjęłam studia magisterskie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Już od drugiego roku jednolitych (pięcioletnich) wówczas studiów, zaczęłam brać udział w eksperymentach elektrofizjologicznych prowadzonych w Pracowni Chronobiologii, Instytutu Zoologii (późniejszy Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii). Badania prowadzone w Pracowni skupiały się na aktywności elektrofizjologicznej struktur mózgowia, budujących zegar biologiczny szczura. Eksperymenty przeprowadzone wraz z zespołem Pracowni, na pozostających w stanie anestezji uretanowej zwierzętach, zaowocowały pierwszym doniesieniem opisującym aktywność pojedynczych neuronów listka kolankowatego bocznego (IGL), charakteryzującą się szczególnym, oscylacyjnym wzorcem generowania potencjałów czynnościowych (**Lewandowski et al., 2000**).

Badania nad spontaniczną aktywnością neuronalną IGL, wykazującą izoperiodyczne zmiany o okresie 126 ± 20 s, kontynuowane były przeze mnie w ramach pracowni magisterskiej. Badania te miały na celu odpowiedzieć na pytanie o zależność obserwowanych oscylacji od położonego przeciwlegle IGL. Istotnym elementem, leżącym u podłoża zaplanowanych badań, była wiedza o tym, że IGL występuje po obu stronach mózgowia i obie te struktury są ze sobą wzajemnie anatomicznie połączone. Dzięki przeprowadzonej analizie wzajemnej korelacji sygnału, dowiedliśmy, że rejestrowane oscylacje w aktywności obu IGL, wykazują nieznaczną preferencję do pojawiania się w przeciwfazie. Ponadto, rejestrując aktywność pojedynczego IGL przy równoczesnym elektrycznym lub chemicznym uszkodzeniu przeciwległej struktury, udowodniliśmy, że zniszczenie jednego IGL nie wpływa na parametry izoperiodycznych oscylacji rejestrowanych w nieuszkodzonym IGL (**Lewandowski et al., 2002**).

W czerwcu 2002 roku uzyskałam tytuł zawodowy magistra biologii, na który złożyła się obrona pracy magisterskiej zatytułowanej *„Endo- czy egzogenne pochodzenie ultradialnej aktywności listka ciała kolankowatego bocznego? Rola szlaku kolankowo-kolankowatego"*, wykonanej pod kierownictwem prof. dr hab. Mariana Henryka Lewandowskiego. W październiku tego samego roku rozpoczęłam studia III stopnia w dziedzinie nauki biologiczne, dyscyplinie biologia, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, w Zakładzie Neurofizjologii i Chronobiologii.

Moja rozprawa doktorska, której promotorem był prof. dr hab. Marian Henryk Lewandowski, nosiła tytuł *„Wpływ neuroprzekaźników układu synchronizującego rytmy okołodobowe ssaków na aktywność struktur zegara biologicznego szczura w preparacie in vitro"*. Pracę wykonałam wykorzystując technikę elektrofizjologicznej, zewnątrzkomórkowej rejestracji aktywności neuronalnej w warunkach *in vitro* oraz technikę barwień immunohistochemicznych. Badania przeprowadzone w ramach doktoratu miały na celu opisanie aktywności neuronalnej IGL w warunkach *in vitro* oraz

scharakteryzowanie reakcji IGL na aktywację receptorów wybranych układów specyficznych i niespecyficznych mózgowia.

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na dokonanie pierwszej charakterystyki spontanicznej aktywności neuronów IGL, w warunkach odizolowania od reszty mózgowia. Wykazaliśmy, że *in vitro* komórki IGL generują trzy typu aktywności: nieregularną, regularną oraz erupcyjną (**Blasiak & Lewandowski, 2004**). W toku dalszych badań dowiedliśmy, że neurony IGL wykazują wysoką czułość na agonistów receptorów glutaminergicznych, ich reakcja na glutaminian sodu może mieć charakter pobudzający, hamujący lub dwufazowy, zaś głównymi receptorami dla glutaminianu w IGL są receptory NMDA (**Blasiak et al., 2007**). Ponadto, wyniki badań przeprowadzonych w czasie realizowanej przeze mnie pracy doktorskiej pozwoliły na opisanie hamującego wpływu aktywacji receptorów serotoninergicznych, na aktywność neuronalną IGL wywołaną glutaminianem (w 57% badanych przypadków) oraz hamujący (w 32%) lub wzmacniający (w 13%) wpływ aktywacji receptorów cholinergicznych na badaną aktywność (**Pekala et al., 2007**).

Opisane badania realizowałam dzięki zdobyciu finansowania z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant promotorski, 2004-2007) oraz pięciu rocznym, wewnętrznym grantom Instytutu Zoologii (od 2002 do 2006).

Stopień naukowy doktora wraz z dyplomem za wybitną rozprawę doktorską otrzymałam w listopadzie 2007 roku. W roku 2008, zatrudniona zostałam na stanowisku asystenta w Instytucie Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. W trakcie badań prowadzonych po obronie stopnia doktora, kontynuowałam pracę nad aktywnością struktur budujących zegar okołodobowy ssaków metodą zewnątrzkomórkowej rejestracji aktywności neuronalnej oraz rozpoczęłam pierwsze na Uniwersytecie Jagiellońskim badania metodą patch clamp w konfiguracji whole-cell, której nauczyłam się podczas krótkiego stażu w laboratorium profesora Klausa-Petera Hoffmana w Ruhr University (Bochum, Niemcy). Niedługo po rozpoczęciu pracy na stanowisku asystenta, wraz z zespołem Zakładu Neurofizjologii i Chronobiologii, opublikowaliśmy pracę, dotyczącą natury unerwienia listka ciała kolankowatego bocznego przez zakończenia nerwu wzrokowego (**Blasiak et al., 2009**). W pracy tej opisaliśmy zróżnicowany wpływ elektrycznej stymulacji nerwu wzrokowego na aktywność neuronów IGL w warunkach *in vitro*. Pokazaliśmy, że stymulacja taka może spowodować pobudzenie z wywołaniem oscylacji, wyłącznie pobudzenie, hamowanie z wywołaniem oscylacji, reakcję dwufazową oraz reakcję wyłącznie hamującą. Stwierdziliśmy, że mnogość rodzajów odpowiedzi neuronów IGL na stymulację nerwu wzrokowego, wskazuje na potencjalne zróżnicowanie czułości populacji komórek IGL na różne bodźce wzrokowe. Ponadto dowiedliśmy, że za pobudzeniową komponentę reakcji na drażnienie nerwu wzrokowego, odpowiedzialne są jonotropowe receptory dla glutaminianu, zaś za komponentę hamującą receptory GABAA.

Dalsze eksperymenty przeprowadzałam, już będąc zatrudniona na stanowisku adiunkta na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (od 2010), z użyciem techniki wewnątrzkomórkowej rejestracji aktywności neuronalnej (patch clamp) oraz wprowadzonych przeze mnie do Zakładu Neurofizjologii i Chronobiologii technik wielo-antygenowych barwień fluorescencyjnych oraz znakowania szlaków neuronalnych, które wykorzystane zostały również do badań składających się na opisane powyżej osiągnięcie habilitacyjne.

W trakcie pracy na stanowisku adiunkta, dzięki otrzymaniu stypendium rządu Australii (*The Australia Awards–Endeavour Research Fellowships*), w roku 2011 wyjechałam na staż naukowy do Instytutu Florey'a (*The Florey Institute of Neuroscience and Mental Health*) w Melbourne, gdzie nauczyłam się technik badań behawioralnych oraz badań z użyciem wektorów wirusowych. W trakcie pobytu w Instytucie Florey'a, wraz z grupą badawczą profesora Andrew Gundlacha, dowiedliśmy, że chroniczna obecność specyficznego agonisty receptorów RXFP3 w płynie mózgowo-rdzeniowym myszy, uzyskana dzięki wprowadzeniu do komórek budujących ściany komór mózgu, odpowiednio zmodyfikowanych genetycznie lentiwirusów, zmienia zachowanie badanych zwierząt. Udowodniliśmy między innymi, że badane zwierzęta, którym został podany zmodyfikowany wirus, wykazują wzmożoną aktywność lokomotoryczną, w porównaniu z grupą kontrolną (**Smith et al., 2013**). Wyniki tych badań potwierdziły udział układu relakyny-3 i jej receptorów w kontroli zachowań związanych ze wzbudzeniem organizmu.

Kontynuując pracę nad rolą relaksyny-3, wraz z zespołem Instytutu Florey'a, dowiedliśmy, że neurony NI, w tym wszystkie syntetyzujące relaksynę-3, wykazują ekspresję receptora dla kortykoliberyny typu 1 (CRF-R1). Scharakteryzowaliśmy reakcję neuronów NI na podanie do płynu mózgowo-rdzeniowego kortykoliberyny, która zależała od natury neurochemicznej badanych neuronów. Dowiedliśmy, że neurony syntetyzujące relaksynę-3 są pobudzane przez kortykoliberynę, zaś pozostałe neurony, nie syntezujące tego peptydu, reagują wyhamowaniem aktywności neuronalnej na jej podanie. Ponadto stwierdziliśmy, że wzorzec występowania potencjałów czynnościowych spontanicznie generowanych przez neurony NI syntetyzujące relaksynę-3, skorelowany jest z wstępującą fazą hipokampalanego rytmu theta. Co ważne, nie zaobserwowaliśmy takiej zależności w przypadku neuronów nie syntetyzujących relaksyny-3. Badania przeprowadzone w warunkach in vitro na skrawkach zawierających NI, potwierdziły bezpośrednią czułość neuronów tego jądra na kortykoliberynę. Udowodniliśmy, że większość neuronów NI jest pobudzana (reaguje zwiększeniem częstotliwością generowanych potencjałów czynnościowych i depolaryzacją błony) przez kortykoliberynę, a obserwowany efekt ma charakter postsynaptyczny. Dzięki znakowaniu szlaków neuronalnych zidentyfikowaliśmy źródło kortykoliberyny w NI. Stwierdziliśmy, że spośród wszystkich znanych źródeł kortykoliberyny w mózgowiu, neurony bocznego pola przedwzrokowego podwzgórza (*lateral preoptic hypothalamus*) są jej głównym źródłem. Nasze badania wskazały

na ważna rolę kortykoliberyny w modulacji aktywności neuronalnej NI, oraz występowanie ścisłej zależności pomiędzy aktywnością neuronów NI syntetyzujących relaksynę-3, a hipokampalanym rytmem theta (**Ma et al., 2013**).

Opisane powyżej prace wraz z pracami wchodzącymi w omówiony wcześniej monotematyczny cykl osiągnięcia habilitacyjnego, zostały wykonane między innymi dzięki zdobyciu przez mnie finansowania z Narodowego Centrum Nauki (grant Sonata 2013-2016), 7 Programu Ramowego (FP7-PEOPLE 2012-2016) oraz trzem wewnętrznych grantów Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych (w 2008, 2010 i 2011 roku).

Wyniki przedstawionych badań dotyczących rytmów okołodobowych i układu relaksynergicznego oraz badań wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, posłużyły za podstawę trzech artykułów przeglądowych (**Blasiak et al., 2017; Kania et al., 2014; Ma et al., 2016**) oraz rozdziału w książce (**Gundlach et al., 2013**).

Zainteresowanie mechanizmami neuronalnymi związanymi z wpływem stresu na funkcjonowanie mózgowia, skłoniło mnie do włączenia się do badań nad funkcjonalnymi i anatomicznymi zmianami w korze mózgowej, zachodzącymi u zwierząt poddanych przedłużającemu się działaniu hormonu stresu - kortykosteronu. Wykorzystując model badawczy, w którym powtarzający się stres zastępowany jest iniekcjami kortykosteronu (przez 7 dni, dwa razy dziennie), udowodniliśmy, że chroniczna (ale nie pojedyncza) ekspozycja na kortykosteron powoduje wzrost częstotliwości występowania spontanicznych, pobudzających prądów postsynaptycznych (*spontaneous excitatory postsynaptic currents*, sEPSC) w neuronach piramidowych warstwy II/III pierwszorzędowej kory ruchowej (M1). Analiza częstotliwości i amplitudy hamujących prądów postsynaptycznych (*spontaneous inhibitory postsynaptic currents*, sEPSC) w neuronach warstwy II/III M1, nie wykazała istotnych zmian. Ponadto wykazaliśmy, że iniekcje kortykosteronu nie wpływają na poziom białek budujących jonotropowe receptory dla glutaminianu i receptory GABAA. Dzięki wprowadzeniu do warsztatu Zakładu Neurofizjologii i Chronobiologii techniki barwień metodą Golgiego oraz analizy anatomii neuronów wykazaliśmy, że podwyższony poziom kortykosteronu nie wpływa na liczbę kolców dendrytycznych badanych neuronów. Przytoczone wyniki eksperymentów pozwoliły na stwierdzenie, że powtarzająca się ekspozycja na kortykosteron, selektywnie i odwracalnie wzmacnia transmisję glutaminergiczną w M1, a zjawisko to może stanowić element neuronalnego mechanizmu leżącego u podłoża dysfunkcji ruchowych indukowanych stresem (**Kula et al., 2016**).

Kontynuując badania nad konsekwencjami powtarzanego stresu na funkcjonowanie i budowę pierwszorzędowej kory ruchowej, zbadaliśmy wpływ ekspozycji na kortykosteron (iniekcje hormonu przez 7 dni, dwa razy dziennie), na miniaturowe pobudzające prądy postsynaptyczne (*miniature excitatory postsynaptic currents*, mEPSCs) oraz plastyczność synaptyczną i budowę neuronów warstwy II/II oraz V M1. Wykazaliśmy, że pod wpływem kortykosteronu następuje wzrost częstotliwości mEPSCs

oraz wzrost liczby rozgałęzień dendrytów apikalnych w neuronach warstwy II/III M1, bez zmian w liczbie kolców dendrytycznych na wypustach tych neuronów. Istotną obserwacją było stwierdzenie, że kortykosteron powoduje upośledzenie indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (*long term potentiation*, LTP) w warstwie II/III M1.

Ponadto wykazaliśmy, że zastosowany model stresu nie wywołuje zmian w częstotliwości i amplitudzie mEPSCs, rejestrowanych w neuronach piramidowych warstwy V M1. Mimo, że nie stwierdziliśmy zmian w budowie drzewek dendrytycznych badanych neuronów warstwy V, zaobserwowaliśmy wzrost liczby kolców dendrytycznych ich apikalnych dendrytów, jednak na zmianę tą złożyły się niedojrzałe, cienkie kolce (*thin spines*)(**Kula et al., 2017**).

Dzięki zgromadzonym przez nas danym, poszerzona została wiedza na temat neuronalnego mechanizmu leżącego u podłoża upośledzenia funkcji ruchowych, wynikających z przedłużającego się działania stresu.

dr Anna Błasiak

Anna Błasiak

Kraków, 21.08.2017