

Załącznik nr 2

AUTOREFERAT (J. POLSKI)

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko: **Ewa Maria Nagańska**

ur. 31.05.1967r w Warszawie

mężatka, dwoje dzieci

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

1992 – Dyplom **lekarza medycyny**; Akademia Medyczna w Warszawie

1999 – Dyplom specjalizacji **I st z neurologii**

2004 – Dyplom specjalizacji **II st z neurologii**

2004 – Stopień naukowy **doktora nauk medycznych**, uzyskany w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Zakład Neuropatologii.

Tytuł rozprawy doktorskiej: “Wpływ jonów cynku na nasilenie wczesnych i późnych uszkodzeń komórek nerwowych hipokampa szczura w modelu anoksji in vitro” (Promotor: Prof. dr hab. n. med. Ewa Matyja)

2011 – Certyfikat z **epileptologii** – Polskie Towarzystwo Epileptologii

2013 – Certyfikat **EEG** – Polskie Towarzystwo Neurofizjologii Klinicznej

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych:

1994 - 1995 – asystent naukowo-dydaktyczny, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

1995 - 1997 – asystent, Oddział Kliniczny Neurologii i Epileptologii Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego im. Prof. W. Orłowskiego, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

od 1998 - obecnie – asystent, Zakład Neuropatologii Doświadczalnej i Klinicznej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

od 2004 - obecnie – starszy asystent, Oddział Kliniczny Neurologii i Epileptologii Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego im. Prof. W. Orłowskiego, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

Kształcenie podyplomowe:

1992 - 1993 – staż podyplomowy, Szpital Miejski w Pruszkowie

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. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) **Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:**

Uszkodzenia motoneuronów rdzenia kręgowego w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności *in vitro* oraz ocena efektywności wybranych związków neuroprotektoryjnych.

Osiągnięcie naukowe, będące podstawą do wnioskowania o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego, stanowi monotematyczny cykl publikacji naukowych o sumarycznym współczynniku oddziaływania **Impact Factor (IF) = 7,249; liczba punktów MNiSW = 100**

b) **Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego** (oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w Załączniku 4):

1. **Nagańska E**, Matyja E, Taraszewska A, Rafałowska J. Protective effect of valproic acid on cultured motor neurons under glutamate excitotoxic conditions. Ultrastructural study. *Folia Neuropathol* 2015; 53 (4): 309-316.

[IF = 1.568; KBN/MNiSW = 20]

Mój wkład w powstanie niniejszej pracy polegał na sformułowaniu hipotezy badawczej, opracowaniu metodologii badań doświadczalnych, przeprowadzeniu doświadczeń na hodowlach rdzenia kręgowego szczura w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności glutaminianu, ocenie materiału w mikroskopie elektronowym, analizie obrazów ultrastrukturalnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu części manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70 %.

2. **Naganska E**, Matyja E. Amyotrophic lateral sclerosis - looking for pathogenesis and effective therapy. *Folia Neuropathol.* 2011; 49(1):1-13. Review.

[IF = 1,234; KBN/MNiSW = 20]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy przeglądowej i przygotowaniu manuskryptu do druku. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

3. **Nagańska E**, Taraszewska A, Matyja E, Grieb P, Rafałowska J. Neuroprotective effect of erythropoietin in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model in vitro. Ultrastructural study. *Folia Neuropathol.* 2010; 48(1):35-44.

[IF = 1.222; KBN/MNiSW = 20]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań doświadczalnych, przeprowadzeniu doświadczeń na hodowlach rdzenia kręgowego szczura w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności glutaminianowej poddanych działaniu erytropoetyny, ocenie materiału w mikroskopie elektronowym, analizie obrazów ultrastrukturalnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu części manuskryptu do druku. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

4. Matyja E, Taraszewska A, **Nagańska E**, Grieb P, Rafałowska J. CDP-choline protects motor neurons against apoptotic changes in a model of chronic glutamate excitotoxicity in vitro. *Folia Neuropathol.* 2008; 46(2):139-48.

[IF = 1,095; KBN/MNiSW = 10]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu badań doświadczalnych na hodowlach rdzenia kręgowego szczura w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności glutaminianowej poddanych działaniu CDP-choliny, ocenie materiału w mikroskopie elektronowym, analizie obrazów ultrastrukturalnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu części manuskryptu do druku. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

5. Matyja E, Taraszewska A, **Nagańska E**, Rafałowska J, Gebarowska J. Astroglial alterations in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. Folia Neuropathol. 2006; 44(3):183-90.

[IF = 0,975; KBN/MNiSW = 10]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu badań doświadczalnych na hodowlach rdzenia kręgowego szczura w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności glutaminianu, ocenie materiału w mikroskopie elektronowym, analizie obrazów ultrastrukturalnych, opracowaniu wyników i przygotowaniu części manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

6. Matyja E, Taraszewska A, **Nagańska E**, Rafałowska J. Autophagic degeneration of motor neurons in a model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. Ultrastruct Pathol. 2005; 29(5):331-9.

[IF = 0,809; KBN/MNiSW = 10]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu badań doświadczalnych na hodowlach rdzenia kręgowego szczura w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności glutaminianu, ocenie preparatów w mikroskopie elektronowym, opracowaniu wyników i wstępnym przygotowaniu tekstu do druku. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

7. Matyja E, **Nagańska E**, Taraszewska A, Rafałowska J. The mode of spinal motor neurons degeneration in a model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. Folia Neuropathol. 2005; 43(1):7-13.

[IF = 0,346; KBN/MNiSW = 10]

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu badań doświadczalnych na hodowlach rdzenia kręgowego szczura w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności glutaminianu, ocenie preparatów w mikroskopie elektronowym, opracowaniu wyników i wstępnym przygotowaniu tekstu do druku. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

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

WSTĘP

Zaburzenia transportu neuronalnego i/lub glejowego glutaminianu (GLU) mogą, poprzez mechanizm przewlekłej ekscytotoksyczności, uczestniczyć w patogenezie wielu chorób neurodegeneracyjnych, w tym również stwardnienia zanikowego bocznego (łac. *sclerosis lateralis amyotrophica* SLA; ang. *amyotrophic lateral sclerosis*, ALS) - postępującej choroby neurodegeneracyjnej, zaliczanej do grupy chorób neuronu ruchowego (ang. *motor neuron diseases*, MND). Istotą ALS jest zwyrodnienie dolnego i górnego neuronu ruchowego, które prowadzi do neurogennego uszkodzenia mięśni szkieletowych [1]. Ekscytotoksyczny wpływ glutaminianu na motoneurony ośrodkowego układu nerwowego uważany jest za jeden z głównych mechanizmów patogenetycznych w sporadycznych postaciach stwardnienia zanikowego bocznego [2, 3, 4]. Można założyć, że model przedłużonej ekscytotoksyczności *in vitro*, oparty na selektywnym hamowaniu wychwytu glutaminianu w warunkach organotypowej hodowli rdzenia kręgowego, odzwierciedla proces zwyrodnieniowy motoneuronów w ALS. Model przewlekłej ekscytotoksyczności *in vitro*, oparty na selektywnym hamowaniu wychwytu glutaminianu i utrzymywaniu jego podwyższonego stężenia pozakomórkowego w hodowlach organotypowych, został opracowany przez Rothstein i wsp. [5] Podstawową zaletą tego modelu jest możliwość utrzymania strukturalnych i metabolicznych interakcji neuronalno-glejowych, co pozwala na ocenę rzeczywistej odpowiedzi neuronów na stosowane czynniki egzogenne. Model ten może być wykorzystany zarówno do badania procesu neurodegeneracji neuronów ruchowych, jak i efektu neuroprotekcynego wybranych związków. Ograniczenie mechanizmu ekscytotoksycznego wydaje się być istotnym elementem skutecznej terapii w tej chorobie [6]. Zasadne wydawało się podjęcie badań, mających na celu ograniczenie ekscytotoksyczności glutaminianu w tym modelu oraz ocenę efektywności wybranych związków neuroprotekcynych na rozwój uszkodzeń neuronalnych. Szczególnie, że na chwilę obecną jedynym lekiem zaaprobowanym do leczenia pacjentów z ALS jest riluzol, który hamuje procesy neurotransmisji przebiegające z udziałem glutaminianu. Dokładny mechanizm jego działania nie jest jednoznacznie określony. Riluzol modyfikuje stężenie

pozakomórkowego glutaminianu poprzez hamowanie presynaptycznego uwalniania glutaminianu, częściowo prawdopodobnie w mechanizmie inaktywacji napięciowo-zależnych kanałów sodowych, a także aktywacji procesów transdukcji sygnału zależnych od białka G. Riluzol hamuje również niektóre postsynaptyczne efekty działania glutaminianu przez niekompetycyjne blokowanie receptorów N-methyl-D-aspartate - NMDA. W badaniach *in vivo* stwierdzano neuroprotektoryjne, przeciwdrgawkowe oraz sedatywne działanie riluzolu. Lek ten nieznacznie wydłuża okres przeżycia pacjentów z ALS oraz opóźnia konieczność wprowadzenia wentylacji mechanicznej [7] Warto prowadzić badania, mające na celu poszukiwanie kolejnych substancji o podobnym mechanizmie działania neuroprotektoryjnego, które mogłyby skutecznie powstrzymać rozwój jednej z najcięższych chorób neurodegeneracyjnych, jaką jest ALS. W przedstawianym osiągnięciu naukowym badano neuroprotektoryjne działanie CDP-choliny, erytropoetyny oraz kwasu walproinowego w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności glutaminianu *in vitro*.

CEL NAUKOWY

Celem badań, będących przedmiotem przedstawianego osiągnięcia naukowego, była szczegółowa ocena zmian morfologicznych w komórkach neuronów ruchowych (MNs) rdzenia kręgowego *in vitro*, poddanych toksycznemu działaniu glutaminianu, a następnie ocena wpływu wybranych związków neuroprotektoryjnych na dynamikę powstających uszkodzeń strukturalnych.

Cele szczegółowe obejmowały:

- 1/ szczegółową ocenę zmian ultrastrukturalnych w motoneuronach rdzenia kręgowego w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności *in vitro*.
- 2/ ocenę udziału autofagii w procesie zwyrodnienia MNs rdzenia kręgowego *in vitro*.
- 3/ ocenę zmian ultrastrukturalnych w komórkach astrogleju, współistniejących ze zmianami zwyrodnieniowymi motoneuronów w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności *in vitro*.
- 4/ ocenę potencjalnego wpływu neuroprotektoryjnych wybranych substancji (CDP-choliny, erytropoetyny oraz kwasu walproinowego) w stosunku do neuronów ruchowych rdzenia kręgowego, poddanych przewlekłej ekspozycji na działanie glutaminianu.

METODYKA

Zmiany ultrastrukturalne oceniano w komórkach hodowli organotypowych odcinka lędźwiowego rdzenia kręgowego szczura, poddanych przewlekłej ekspozycji na specyficzne blokery wychwytu glutaminianu: DL-threo- β -hydroxyaspartate (THA) i L-transpyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC).

WYNIKI (omówienie poszczególnych publikacji)

(2) Naganska E, Matyja E. Amyotrophic lateral sclerosis - looking for pathogenesis and effective therapy. *Folia Neuropathol.* 2011;49(1):1-13. Review

Model przewlekłej ekscytotoksyczności in vitro, oparty na selektywnym hamowaniu wychwytu glutaminianu i utrzymywaniu jego podwyższonego stężenia pozakomórkowego w hodowlach organotypowych, wykorzystany w prezentowanych badaniach doświadczalnych, odzwierciedla proces zwyrodnieniowy motoneuronów w przebiegu stwardnienia zanikowego bocznego.

W pracy przeglądowej została przedstawiona patogeneza, obraz kliniczny, diagnostyka oraz dostępne formy leczenia ALS.

Stwardnienie zanikowe boczne jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną, charakteryzującą się utratą neuronów ruchowych rdzenia kręgowego, pnia mózgu oraz kory ruchowej. Kluczowym objawem ALS jest osłabienie mięśni, które występuje u około 60% pacjentów. Osłabieniu towarzyszą fasykulacje i skurcze mięśni, zwłaszcza w obrębie dłoni i stóp. W kolejnych stadiach choroby osłabienie mięśni postępuje aż do głębokich niedowładów i/lub porażenia. Pojawiają się objawy niewydolności oddechowej oraz problemy z połykaniem. Po zajęciu mięśni oddechowych, pacjent zwykle wymaga oddechu wspomaganego. Przebieg choroby jest jednak różny w poszczególnych przypadkach.

Najczęściej choroba w ciągu 2-5 lat od rozpoznania prowadzi do śmierci w przebiegu niewydolności oddechowej [8]. Niezależnie od zaawansowania badań neurobiologicznych, molekularnych i genetycznych, ALS ze względu na brak skutecznych metod leczenia, pozostaje wciąż jedną z chorób neurozwyrodnieniowych o najgorszym rokowaniu. Choroba stanowi ogromne wyzwanie dla środowisk naukowych i klinicystów.

Wskaźnik rozpowszechnienia ALS określa się na 4-6/100 000 osób. Średni wiek pacjenta w momencie zachorowania wynosi 55-65 lat, ale choroba może wystąpić również u ludzi

młodych. ALS w 90-95% przypadków występuje jako choroba sporadyczna (*sporadic ALS - SALS*), a w około 5-10% jest rozpoznana jako postać rodzinna (*familial ALS - FALS*) o dziedziczeniu najczęściej autosomalnie dominującym. Około 20% postaci rodzinnych ALS jest wynikiem dziedziczonej mutacji w obrębie genu zlokalizowanego na 21 chromosomie i kodującego enzym dysmutazę nadtlenkową 1 (*superoxide dismutase 1, SOD1*). Jednak nie wszystkie osoby z rozpoznaną mutacją SOD1 rozwijają objawy ALS. Obecnie podstawową rolę w patogenezie ALS przypisuje się mutacjom w genie C9ORF72, które dotyczą około 34.2% rodzinnych przypadków ALS. Klinicznie FALS i SALS są zasadniczo podobne, ale postać dziedziczna najczęściej dotyka osoby młodsze [9]. Mechanizmy patogenetyczne, leżące u podłoża ALS pozostają niejasne, ale podkreśla się szerokie spektrum czynników etiologicznych, takich jak genetyczne, autoimmunologiczne, środowiskowe, stres oksydacyjny, ekscytotoksyczny wpływ glutaminianu, uszkodzenie mitochondriów, zaburzenia transportu aksonalnego, patologię komórek glejowych, zaburzenia metabolizmu DNA i RNA, toksyczny efekt działania metali ciężkich, infekcje wirusowe, zespoły paranowotworowe, rozrost układu chłonnego, paraproteinemie i wiele innych [10, 11, 12, 13, 14, 15]. W 1993 roku zidentyfikowano mutację w genie kodującym enzym - dysmutazę nadtlenkową 1 (SOD1), związaną z niektórymi przypadkami rodzinnej postaci ALS [16]. SOD1 działa jako antyoksydant i chroni komórki przed uszkodzeniem DNA, spowodowanym akumulacją wolnych rodników tlenowych, produkowanych w komórce w procesach prawidłowego metabolizmu. Mimo to, wiele wyników badań wskazuje, że toksyczność zmutowanej SOD1 nie jest następstwem obniżonej aktywności antyoksydacyjnej, ale raczej „nabyciem” nieznannej funkcji toksycznej. Scharakteryzowano szlaki molekularne, w których zmutowana SOD1 uczestniczy w akumulacji zmienionych białek z możliwością tworzenia nitek amyloidowych wewnątrz siateczki endoplazmatycznej w neuronach ruchowych, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki. Wyniki te sugerują podobieństwo ALS do chorób związanych z akumulacją nieprawidłowo skonformowanych białek, takich jak choroby prionowe [17].

Wiele innych genów, których mutacje wydają się odgrywać rolę w patogenezie ALS, kodują białka uczestniczące w szlakach przemian RNA, obejmujących transkrypcję RNA, usuwanie niekodujących intronów w etapie składania RNA, translację i degradację. ALS i inne choroby neuronu ruchowego mogą być związane z mutacją w obrębie różnych genów, między innymi *ANG, ELP3, FUS/TLS, SETX, SMN i TARDBP* [18, [19, 20].

W obrazie histopatologicznym ALS dominują ubytki komórek nerwowych w obrębie górnego, oraz dolnego neuronu ruchowego. Ubytki neuronalne dotyczą szczególnie dużych komórek rogów przednich na całej długości rdzenia kręgowego. Degeneracja dróg korowordzeniowych słupów przednich i bocznych rdzenia kręgowego jest szczególnie widoczna w dolnych segmentach rdzenia kręgowego [21]. Podtrzymuje to hipotezę o wstecznej degeneracji aksonów w mechanizmie „*dying back*”. W degenerujących pierwotnie drogach ruchowych występuje wyraźna utrata grubych zmielinizowanych włókien z towarzyszącą glezją astrocytarną. Mięśnie prążkowane wykazują cechy odnerwienia, czyli tzw. neurogenne zaniku mięśni. Ocalałe neurony ruchowe często są obkurczone i wykazują akumulację ziarnistości lipofuscynowych oraz obecność różnorodnych wtrętów wewnątrzcytoplazmatycznych. W ALS występuje rozlana astroglejoza z wyraźną immunoreaktywnością kwaśnego białka włókienkowego (*fibrillary acidic protein* - GFAP). Biorąc pod uwagę połączenia neuronalno-glejowe wydaje się, że komórki astroglejowe są bezpośrednio związane z procesem degeneracji motoneuronów w następstwie ekscytotoksyczności glutaminianu [22].

Niezależnie od lepszego rozumienia mechanizmów, leżących u podłoża ALS, nadal nie ma skutecznego leczenia tej choroby. Tylko jedna substancja – riluzol - została zaaprobowana przez FDA do leczenia ALS [23].Przeprowadzono wiele badań klinicznych z zastosowaniem różnych substancji o działaniu potencjalnie neuroprotekcijnym, takich jak m.in: memantyna, tamoxifen, ceftriaxone, kreatyna, miotrofina, celebrex, neurodex, oxandrolone, CoQ10, topiramet, xaliproden, indinawir, minocyclina, buspiron i wielu innych, jednak żadna z nich nie uzyskała rekomendacji do leczenia pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym [24]. Podejmowane próby stosowania terapii immunosupresyjnych i immunomodulujących również nie dały spodziewanego efektu. Złagodzenie objawów oraz poprawę jakości życia chorego można uzyskać wykorzystując leczenie objawowe w postaci kontroli bólu, objawów depresji, zaburzeń snu i zaparc. Ze względu na całkowity brak sukcesu terapeutycznego po stosowaniu różnych form farmakoterapii, uwagę skierowano na metody terapii regeneracyjnej poprzez transplantację komórek macierzystych [6]. Pozytywny efekt tej terapii obserwowano w modelach zwierzęcych. Na świecie, również w Polsce, prowadzi się coraz więcej prób z podawaniem komórek macierzystych pacjentom z ALS [25]. Ocenia się efekt działania komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego pacjentów, jak i sznurów pępowinowych (galarety Whartona), podawanych według różnych schematów terapeutycznych. Komórki macierzyste charakteryzują się

dwiema unikalnymi cechami: są zdolne do nieograniczonej liczby podziałów, czyli odnawiania swojej puli komórkowej, oraz do przekształcania się w inne typy komórek. Niestety większość komórek macierzystych nie przekształca się tak, jak byśmy tego oczekiwali. Komórki szybko obumierają i nie są w stanie tworzyć połączeń, odpowiadających połączeniom naturalnym. Uwalniają jednak szereg czynników, wykazujących wpływ ochronny na neurony objęte procesem chorobowym. Skuteczność leczenia oceniano w oparciu o spowolnienie przebiegu choroby, przy czym poszczególni pacjenci reagowali w różny sposób.

Biorąc pod uwagę negatywne wyniki prowadzonych dotychczas intensywnych badań doświadczalnych i klinicznych, podejmujących kolejne próby terapii farmakologicznej w ALS, uzasadnione wydaje się kontynuowanie badań nad określeniem szczegółowych mechanizmów patogenetycznych, prowadzących do rozwoju i progresji choroby, co może być punktem wyjścia do opracowania skutecznej farmakoterapii przyczynowej.

Ze względu na fakt, że ekscytotoksyczny wpływ glutaminianu na motoneurony ośrodkowego układu nerwowego uważany jest za jeden z głównych mechanizmów patogenetycznych w sporadycznych postaciach stwardnienia zanikowego bocznego, ograniczenie tego mechanizmu wydaje się być istotnym elementem skutecznej terapii w tej chorobie. Użytecznym modelem doświadczalnym ALS okazało się ekscytotoksyczne uszkodzenie motoneuronów rdzenia kręgowego szczura w warunkach *in vitro*. Model przewlekłej ekscytotoksyczności *in vitro*, oparty na selektywnym hamowaniu wychwytu glutaminianu i utrzymywaniu jego podwyższonego stężenia pozakomórkowego w hodowlach organotypowych, został opracowany przez Rothstein i wsp. [5]. Podstawową zaletą tego modelu jest możliwość utrzymania strukturalnych i metabolicznych interakcji neuronalno-glejowych, co pozwala na ocenę rzeczywistej odpowiedzi neuronów na stosowane czynniki egzogenne.

Wykorzystanie modelu przewlekłej ekscytotoksyczności glutaminianu *in vitro* do oceny efektu ochronnego wybranych związków o właściwościach neuroprotekcyjnych było podstawą prowadzonego cyklu badań eksperymentalnych.

Badania prowadzono na modelu hodowli organotypowej rdzenia kręgowego odcinka lędźwiowego, uzyskanego od 8-dniowych noworodków szczura. Po 10-14 dniach *in vitro*, dobrze zróżnicowane hodowle poddawano przewlekłemu działaniu glutaminianu w

następstwie ekspozycji na działanie blokerów wychwyty glutaminianu - THA (threo-hydroxy-aspartate) oraz PDC (L-trans-pyrrolidine-2, 4-dicarboxylate). W modelu przewlekłej ekscytotoksyczności oceniano efekt neuroprotekcyny wybranych związków: CDP-choliny, erytropoetyny i kwasu walproinowego. Równolegle prowadzono grupy kontrolne: 1/ bez podawania jakichkolwiek dodatkowych substancji; 2/ z podaniem tylko inhibitorów wychwyty glutaminianu 3/ z podaniem tylko badanych substancji. Po 2, 24 godzinach oraz 3, 5, 7, 14 i 28 dniach inkubacji hodowle utrwalano do mikroskopu elektronowego. Ultracienkie skrawki barwiono w octanie uranylu i cytrynianie ołowiu, a następnie oceniano w mikroskopie elektronowym JEOL 1200EX.

(7) Matyja E, Nagańska E, Taraszewska A, Rafałowska J. The mode of spinal motor neurons degeneration in a model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. Folia Neuropathol. 2005; 43(1):7-13

W pierwszym etapie badań doświadczalnych przeprowadzono szczegółową ocenę zmian ultrastrukturalnych w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności *in vitro*.

Glutaminian jest podstawowym neurotransmiterem pobudzającym w ośrodkowym układzie nerwowym, jednak w nadmiarze może wywierać wpływ neurotoksyczny [26, 27]. Uważa się, że zjawisko przewlekłej ekscytotoksyczności odgrywa podstawową rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. Mechanizm powolnej degeneracji motoneuronów w następstwie przewlekłego hamowania wychwyty glutaminianu nie jest do końca poznany. Sugerowano, że selektywna utrata motoneuronów w przebiegu ALS jest efektem zaburzeń transportu glutaminianu w następstwie przewlekłej ekspozycji komórek nerwowych i glejowych na glutaminian nagromadzony w przestrzeni okołokomórkowej i szczeliny synaptycznej. Transportery glutaminianu odgrywają istotną rolę w utrzymywaniu właściwego stężenia pozakomórkowego glutaminianu poniżej poziomu toksycznego, co zapobiega nadmiernej stymulacji receptorów. Rozpoznano szereg transporterów glutaminianu, wśród nich GLAST, GLT-1, których ekspresja stwierdzana jest w obrębie błony komórkowej astrocytów [28, 29]. Zidentyfikowano szereg podtypów transporterów aminokwasów pobudzających (ang. *excitatory amino acid transporters* - EAATs) w tkankach ssaków. Dwa blokery wychwyty glutaminianu: DL-threo- β -hydroxyaspartate (THA) i L-trans-pyrrolidine-2, 4-dicarboxylate (PDC) określono jako potencjalne inhibitory receptorów EAAT [30].

Sugerowano również, że komponent glejowy może być włączony w patologię postępującego zaniku motoneuronów w przebiegu ALS w następstwie przewlekłej toksyczności glutaminianu .

Celem pracy było określenie zmian ultrastrukturalnych w motoneuronach w modelu powolnej neurodegeneracji *in vitro*. Zmiany ultrastrukturalne oceniano w komórkach hodowlach organotypowych odcinka lędźwiowego rdzenia kręgowego szczura, poddanych przewlekłej ekspozycji na działanie specyficznych blokerów wychwytu glutaminianu: DL-threo- β -hydroxyaspartate (THA) i L-trans-pyrrolidine-2, 4-dicarboxylate (PDC). Hodowle kontrolne utrzymywano w warunkach standardowych.

Kontrolne hodowle rdzenia kręgowego utrzymywały dobrze zachowane duże motoneurony i liczne prawidłowo zbudowane komórki astroglejowe, głównie typu protoplazmatycznego do 28 dnia *in vitro*. Prawidłowe motoneurony charakteryzowały się obecnością dużego jądra z rozproszoną chromatyną i wyraźnie odgraniczonym jąderkiem, otoczonego cytoplazmą, zawierającą dobrze rozwiniętą siateczkę endoplazmatyczną, aparat Golgiego, liczne mitochondria i neurotubule. Hodowle rdzenia kręgowego, poddane ekspozycji na THA lub PDC, wykazywały postępujące zmiany degeneracyjne motoneuronów, zależne od stężenia stosowanej substancji i czasu trwania ekspozycji. W komórkach poddanych działaniu zarówno THA, jak i PDC obserwowano szerokie spektrum zmian morfologicznych, charakteryzujących apoptozę, autofagie lub martwicę.

Do 24 godzin ekspozycji na THA w stężeniu 100 μ M większość neuronów wykazywała niewielkie nieprawidłowości morfologiczne, ograniczone do obrzmienia mitochondriów. W 3 dniu po podaniu THA w niektórych neuronach stwierdzano cechy zwyrodnienia z nagromadzeniem wakuoli i pęcherzyków, aż do masywnej wakuolizacji cytoplazmy. Tylko w obrębie pojedynczych neuronów występowały zmiany martwicze z całkowitą degeneracją organelli cytoplazmatycznych i jądra komórkowego. W okresie od 3 do 7 dnia po ekspozycji na THA neurony wykazywały różnorodne uszkodzenia, obejmujące wakuolizację cytoplazmy lub typowe zmiany apoptotyczne.

W późniejszych stadiach od 7 do 21 dnia po ekspozycji dominowały uszkodzenia o cechach autofagii. Natomiast zmiany typowe dla apoptozy, z kondensacją i marginalizacją chromatyny jądrowej pod błoną jądrową oraz towarzyszącym obkurczeniem ciała komórkowego, przy względnie dobrze zachowanych cytoorganellach, widoczne były sporadycznie. W większości motoneuronów zmiany apoptotyczne w obrębie jądra komórkowego współwystępowały z cechami typowo martwiczymi lub cechami

autofagicznego uszkodzenia cytoplazmy. W niektórych neuronach obserwowano agregację chromatyny jądrowej z towarzyszącą zaawansowaną wakuolizacją cytoplazmy. Wiele motoneuronów wykazywało cechy obwodowej kondensacji chromatyny, wskazującej na wczesne zmiany apoptotyczne, podczas gdy w ich cytoplazmie obserwowano mniej lub bardziej zniszczone cytoorganella i wakuole autofagiczne. Część motoneuronów wykazywała wyraźne zmiany cytoplazmatyczne, typowe dla zmian autofagicznych, z obecnością autofagosomów, otoczonych podwójną błoną i wypełnionych degenerującymi organellami cytoplazmatycznymi. Fragmenty degenerujących komórek i ciał apoptotycznych, zawierających elementy skondensowanej chromatyny i struktur cytoplazmatycznych, były fagocytowane przez otaczające komórki glikowe. Wyższe stężenia THA (500 μ M) powodowały gwałtownie postępujące zmiany zwyrodnieniowe w obrębie motoneuronów w ciągu 3 dni. Często obserwowano całkowicie uszkodzone neurony, zawierające skondensowaną chromatynę i zniszczone organella komórkowe. Motoneurony z cechami apoptozy i/lub autofagii widoczne były w późniejszych okresach obserwacji. Podawanie PDC do środowiska odżywczego hodowli powodowało podobne, lecz nieco mniej nasilone zmiany morfologiczne w odpowiednich okresach ekspozycji.

Przeprowadzone badania morfologiczne procesu zwyrodnieniowego motoneuronów w modelu ALS *in vitro* wykazały obecność cech ultrastrukturalnych typowych dla różnych rodzajów śmierci komórki. Nasilenie zmian degeneracyjnych motoneuronów po podaniu THA i PDC wykazywało zależność od stężenia podanego związku. Obserwowane zmiany ultrastrukturalne odpowiadały zarówno martwicy, apoptozie, jak i autofagii, ale najczęściej występowały uszkodzenia apoptotyczno-martwicze lub apoptotyczno-autofagiczne. Degeneracji motoneuronów towarzyszyły wyraźne zmiany w komórkach astrogleju, które często poprzedzały masywne uszkodzenie neuronów. Już po 24 godzinach inkubacji z THA i PDC, astrocyty protoplazmatyczne wykazywały cechy obrzmienia obwodowych części cytoplazmy, natomiast w późniejszych stadiach doświadczenia obserwowano obecność nieregularnych wakuoli w cytoplazmie.

Podsumowanie: Wyniki przedstawionej pracy sugerują, że motoneurony mogą ginąć na drodze różnych procesów, obejmujących apoptozę, martwicę i autofagocytosę, oraz dokumentują występowanie ciągłości pomiędzy apoptozą i martwicą oraz apoptozą i autofagocytosą w warunkach neurodegeneracji *in vitro*.

(6) **Matyja E, Taraszewska A, Nagańska E, Rafałowska J. Autophagic degeneration of motor neurons in a model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. *Ultrastruct Pathol.* 2005; 29(5):331-9.**

Biorąc pod uwagę fakt, że coraz więcej doniesień w literaturze wskazuje na znaczący udział autofagii, jako modelu śmierci komórkowej, uczestniczącej w różnych procesach patologicznych, leżących u podłoża chorób neurodegeneracyjnych, w tym ALS, postanowiono ocenić udział autofagii w procesie zwyrodnienia MNs rdzenia kręgowego *in vitro*.

Autofagia jest dobrze poznanym procesem fizjologicznym, związanym z wymianą komórek w organizmie. Stanowi ona formę odpowiedzi komórki na działanie szeregu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych czynników uszkodzających. Proces autofagii może odgrywać zarówno rolę protekcyjną, jak i destrukcyjną w procesach fizjologicznych oraz patologicznych [31, 32]. Celem badań była określenie udziału autofagii w procesie neurodegeneracji w modelu ALS *in vitro*. Udział tego typu śmierci neuronów oceniano w hodowlach organotypowych rdzenia kręgowego szczura, poddanych przewlekłej ekspozycji na blokery wychwytu glutaminianu THA oraz PDC w stężeniach 100 μ M. Po 2 i 24 godzinach, 3, 5, 7, 14 i 28 dniach od początku ekspozycji, hodowle były oceniane w mikroskopie elektronowym.

Hodowle poddane działaniu THA i PDC wykazywały postępujące zmiany zwyrodnieniowe motoneuronów. Po 7-14 dniach obok typowych zmian martwiczych i apoptotycznych obserwowano również cechy degeneracji o typie autofagocytozy. Liczne motoneurony wykazywały obecność zmian wakuolarnych w obrębie cytoplazmy. Wakuole autofagiczne były zazwyczaj złożone z fragmentów cytoplazmy, zawierających cytoorganella, takie jak rybosomy, mitochondria i/lub wakuole. Cytoplazma niektórych dużych motoneuronów zawierała liczne lizosomy z obecnością drobnych ciał gęstych i autofagosomów. Kanąły szorstkiej siateczki endoplazmatycznej i wolne rybosomy widoczne były zwykle w przestrzeni okołojądrowej. Inne neurony wykazywały obecność nieprawidłowo rozwiniętego aparatu Golgiego ze zwiększoną liczbą małych i większych pęcherzyków, związanych z tworzeniem autofagosomów oraz elektronowo-gęstych ciał ziarnistych i wielobłoniastych. Agregaty powiększonych pęcherzyków Golgiego tworzyły często skupiska struktur wielopęcherzykowatych i dużych autofagosomów.

Między 14 i 28 dniem obserwacji, w uszkodzonych komórkach obecne były duże wielopęcherzykowate struktury i/lub kompleksy autofagosomów, poroździelane błonami. Czasami motoneurony z zaawansowanymi zmianami degradacji cytoplazmy o cechach autofagocytozy zawierały dobrze zachowane jądro, otoczone strukturami wielobłoniastymi oraz cytoplazmę bogatą w wolne rybosomy. Poza neuronami z dobrze zachowanymi jądrami, widoczne były neurony z nasilonymi zmianami apoptotycznymi w obrębie jądra w postaci obwodowej kondensacji chromatyny jądrowej. Typowe zmiany apoptotyczne w obrębie jądra często współwystępowały z zaawansowanymi zmianami martwiczymi lub zmianami o cechach autofagii w obrębie cytoplazmy. Masywnie uszkodzone neurony wykazywały zaawansowane gromadzenie neurotubuli i zmiany degeneracyjne w obrębie mitochondriów. W niektórych całkowicie uszkodzonych neuronach stwierdzano równocześnie cechy martwicy, apoptozy i autofagii. Resztki uszkodzonych neuronów fagocytowane były przez otaczające wypustki komórek astroglejowych. Wyjątkowo obserwowano powiększone aksony wypełnione autofagosomami i ciałami ciemnymi z centralnym gromadzeniem neurotubuli i neurofilamentów.

Wykazano, że różne typy śmierci komórkowej mogą się na siebie nakładać, a dokładne rozróżnienie między nimi nie zawsze jest możliwe [33]. Autofagia może być indukowana przez proces apoptozy lub współwystępować z cechami apoptozy. Dwa podstawowe typy śmierci komórkowej, martwica i apoptoza, zasadniczo różnią się morfologicznie. Typowy obraz martwicy obejmuje wczesną utratę ciągłości błon plazmatycznych, prowadzącą do lizy komórki z towarzyszącymi cechami odpowiedzi zapalnej [34]. Natomiast apoptoza jest szczególnym typem śmierci komórkowej, często występującej w przebiegu fizjologicznych i patologicznych procesów, która charakteryzuje się marginalizacją chromatyny jądrowej oraz obkurczeniem komórki z formowaniem ciał apoptotycznych, bez jednoczesnej odpowiedzi zapalnej [35]. Autofagia jest związana przede wszystkim z nadmiernym rozwojem struktur lizosomalnych, obejmujących zarówno pierwotne, jak i wtórne lizosomy oraz wakuole autofagiczne. Różne organella, takie jak mitochondria, rybosomy czy krople glikogenu są głównymi składnikami wakuoli autofagicznych. Warto zauważyć, że sekwestracja autofagiczna i pochłanianie organelli związane z uwalnianiem enzymów lizosomalnych zwykle nie prowadzi do całkowitej destrukcji innych struktur cytoplazmatycznych [36, 37]. W niektórych sytuacjach autofagia może nawet pełnić rolę ochronną w następstwie redukcji metabolizmu i procesów sekwestracji organelli [38, 39]. Sekwestracja mitochondriów w wakuolach autofagicznych może zapobiegać uwalnianiu

cytochromu C i tym samym chronić komórkę przed martwicą. Tak więc określenie „autofagiczna śmierć komórkowa” powinna być ograniczona do przypadków, gdy nasilona aktywacja pierwotnych lizosomów i powstawanie wakuoli autofagicznych oraz autofagosomów są dla komórki letalne.

Podsumowanie: Prezentowane wyniki badań wykazały udział autofagii w procesie postępującej degeneracji motoneuronów oraz współistnienie degeneracji o typie autofagii z innymi typami śmierci motoneuronów, zwłaszcza apoptozy. Liczne motoneurony wykazywały wyraźne zmiany apoptotyczne w obrębie jądra, z typową obwodową kondensacją i marginalizacją chromatyny jądrowej z towarzyszącymi nasilonymi zmianami degeneracyjnymi w obrębie cytoplazmy o cechach typowych dla czystej autofagii lub mieszanych zmian autofagiczno-martwiczych. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na istotną rolę procesu autofagii w chorobach neurodegeneracyjnych.

Zdjęcie ultrastrukturalne komórki ze zmianami o typie autofagii, zamieszczone w niniejszej pracy, zostało wybrane przez Redakcję *Ultrastructural Pathology* jako „cover picture” i znalazło się na okładce numeru czasopisma.

(5) ***Matyja E, Taraszewska A, Nagańska E, Rafałowska J, Gebarowska J. Astroglial alterations in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model of slow glutamate excitotoxicity in vitro. Folia Neuropathol. 2006; 44(3):183-90.***

Biorąc pod uwagę dane, wskazujące na ochronną rolę astrogleju w stosunku do neuronów w mechanizmie wychwytu glutaminianu z przestrzeni okołokomórkowej [40], zaplanowano kolejny etap badań, mający na celu ocenę udziału komórek glejowych w patogenezie postępującego zwyrodnienia motoneuronów, poddanych przewlekłej ekspozycji na działanie glutaminian

Przedmiotem tej pracy była ocena zmian ultrastrukturalnych w komórkach astrogleju, współistniejących ze zmianami zwyrodnieniowymi motoneuronów w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności *in vitro*. Badania przeprowadzono na hodowlach organotypowych rdzenia kręgowego odcinka lędźwiowego szczura, poddanych działaniu blokerów wychwytu glutaminianu: THA i PDC.

Do 28 dnia *in vitro* kontrolne hodowle rdzenia kręgowego zawierały dobrze zachowane duże motoneurony oraz liczne komórki astroglejowe typu protoplazmatycznego. Prawidłowo zbudowane astrocyty w hodowlach kontrolnych zawierały elektronowo jasną

cytoplazmę z rozproszonymi rybosomami, wąskimi kanałami siatki śródplazmatycznej, małymi mitochondriami, czasem ciałami gęstymi lub kroplami lipidów oraz ekscentrycznie położonym, okrągłym lub owalnym jądrem, zawierającym małe jąderko. Hodowle poddane ekspozycji na działanie THA lub PDC wykazywały cechy stopniowo postępującej neurodegeneracji oraz wyraźne zmiany w komórkach astroglejowych, zwłaszcza typu protoplazmatycznego. Liczne astrocyty wykazywały nasilone zmiany w obrębie cytoplazmy, podczas gdy ich jądra pozostawały względnie dobrze zachowane. Zmiany te widoczne były już po 24 godzinach po ekspozycji na THA. Nieregularne wakuole czasami zajmowały większą część cytoplazmy komórek astroglejowych. Zazwyczaj obwodowa część cytoplazmy była bardziej zniszczona. Czasami w obrębie astrocytów z cechami obrzmienia cytoplazmy stwierdzano obecność uszkodzonych organelli, takich jak obkurczone mitochondria, ciała elektronowo gęste czy wielopęcherzykowe oraz wakuole autofagiczne. Niektóre komórki glejowe zawierały nieprawidłowo rozwinięty aparat Golgiego ze zwiększoną liczbą małych i dużych pęcherzyków. Po 5 dniach ekspozycji w niektórych komórkach widoczne były nadmiernie rozbudowane kanały siateczki śródplazmatycznej z agregacją krótkich kanałów lub tworzeniem długich, rozgałęzionych, wielobłoniastych struktur. Po 14 i 28 dniach po ekspozycji na działanie THA i PDC, obrzmienie cytoplazmy astrocytów zmniejszało się, podczas gdy wewnątrzcytoplazmatyczne wakuole różnej wielkości i kształtu były coraz liczniejsze. Duże wakuole zajmowały głównie obwodowe części cytoplazmy lub były rozproszone w całym perykarionie i wypustkach komórkowych. Obserwowano również różnego stopnia kondensację cytoplazmy w obrębie zwakuolizowanych astrocytów; natomiast po 3 tygodniach nie obserwowano wzmożonej produkcji i nasilonej akumulacji gliofilamentów. Uszkodzenia neuronalne w przebiegu różnych procesów patologicznych zwykle są związane ze zjawiskiem, określanym jako tzw. "reaktywna astroglejoza", która długo uważana była za niespecyficzną odpowiedź komórek glejowych na różne czynniki toksyczne. Reaktywne astrocyty wykazują charakterystyczne cechy morfologiczne w postaci powiększonego jądra, zwiększonej liczby gliofilamentów oraz wyraźną ekspresją kwaśnego białka włóknikowego (ang. *glial fibrillary acidic protein* - GFAP). Nasilona astroglejoza jest powszechnym zjawiskiem obserwowanym u pacjentów z ALS.

Glutaminian jest głównym neurotransmiterem pobudzającym w ośrodkowym układzie nerwowym. Astrocyty uczestniczą w procesie pobudliwości neuronalnej przez kontrolowanie pozakomórkowego poziomu glutaminianu i zwrotnym wychwycie glutaminianu. Wydaje się, że przewlekła neurotoksyczność glutaminianu w następstwie

nieefektywnego wychwytu zwrotnego glutaminianu uczestniczy w patogenezie wielu stanów patologicznych, również w procesie selektywnego ubytku motoneuronów w przebiegu ALS [41, 42]. Uszkodzone motoneurony wytwarzają mediatory, np wolne rodniki tlenowe, które powodują zaburzenia wychwytu glutaminianu przez otaczające astrocyty [43, 44]. Astrocyty mogą nasilać ekscytotoksyczne uszkodzenie neuronów również poprzez aktywne uwalnianie glutaminianu.

Podsumowanie: Prezentowane badania ultrastrukturalne wykazały współwystępowanie zwyrodnienia motoneuronów i zaburzeń funkcji astrocytów w modelu ALS *in vitro*. Znacznego stopnia zmiany widoczne były głównie w obrębie astrocytów protoplazmatycznych i obejmowały obecność nieregularnych wakuoli oraz gromadzenie nieprawidłowo zbudowanych kanałów gładkiej siateczki endoplazmatycznej. W czasie 3 tygodni nie obserwowano nasilonego wytwarzania lub gromadzenia gliofilamentów, typowych dla reaktywnej astroglejozy.

Kolejne etapy badań eksperymentalnych dotyczyły oceny potencjalnego wpływu neuroprotekcynnego wybranych substancji w stosunku do neuronów ruchowych rdzenia kręgowego, poddanych przewlekłej ekspozycji na działanie glutaminianu.

(4) **Matyja E, Taraszewska A, Nagańska E, Grieb P, Rafałowska J. CDP-choline protects motor neurons against apoptotic changes in a model of chronic glutamate excitotoxicity *in vitro*. Folia Neuropathol. 2008, 46(2):139-48.**

Cytidine-5-diphosphocholine (CDP-choline, citicoline) jest endogennym nukleozydem, związanym z procesem wytwarzania fosfolipidów i struktur błonowych. Wykazuje ona korzystne działanie w modelach uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, takich jak niedokrwienie mózgu, choroby neurodegeneracyjne, czy uszkodzenie rdzenia kręgowego [45, 46, 47]. Celem badań ultrastrukturalnych była ocena potencjalnego wpływu neuroprotekcynnego CDP-choliny w stosunku do zmian w neuronach w modelu ALS *in vitro* w następstwie ekscytotoksycznego działania glutaminianu.

Organotypowe hodowle szczyrego rdzenia kręgowego z odcinka lędźwiowego były poddawane działaniu THA po wcześniejszej ekspozycji na CDP-cholinę. Hodowle rdzenia

kręgowego szczura, poddane ekspozycji wyłącznie na CDP-cholinę, zawierały dość dobrze zachowane neurony ruchowe z dużym jądrem, rozproszoną chromatyną i cytoplazmą zawierającą liczne organella. Obserwowano prawidłowe komórki astrogleju i neuropil zawierający wypustki neuronalne i glejowe. Przewlekła ekspozycja na THA powodowała przede wszystkim zmiany charakterystyczne dla martwiczego uszkodzenia komórek z całkowitą destrukcją cytoorganelli. Obserwowano również zmiany apoptotyczne z mniej lub bardziej nasiloną agregacją chromatyny jądrowej w postaci gęstych skupisk pod błoną jądrową. W hodowlach poddanych ekspozycji na THA po wcześniejszym podaniu CDP-choliny wyjątkowo obserwowano uszkodzone motoneurony we wczesnych okresach obserwacji. Obserwowano wyraźnie mniej nasilony rozwój typowych zmian apoptotycznych, podczas gdy występowały zarówno zmiany martwicze jak i autofagiczne w uszkodzonych neuronach, charakterystyczne dla uszkodzeń po ekspozycji na THA. Całkowicie uszkodzone komórki martwicze występowały sporadycznie. Częściej widoczne były natomiast motoneurony z cechami morfologicznymi charakterystycznymi dla autofagocytozy, zwłaszcza po dłuższym czasie (7, 14 dni) obserwacji. W cytoplazmie neuronów występowały liczne wakuole autofagiczne różnej wielkości i kształtu, zawierające uszkodzone organella, np. rybosomy, mitochondria, różnego rodzaju wakuole. W niektórych dużych neuronach ruchowych występowały liczne wtórne lizosomy i drobne ciała gęste lub autofagosomy. Większość motoneuronów z zaawansowanymi zmianami autofagicznymi w cytoplazmie zawierała dobrze zachowane jądra komórkowe.

Podsumowanie: Prezentowane badania wykazały, że CDP-cholina wywiera efekt neuroprotektyny w przebiegu postępującego uszkodzenia motoneuronów w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności *in vitro*. Hamowane były głównie zmiany apoptotyczne, podczas gdy zmiany martwicze i autofagiczne nie ulegały zmniejszeniu. Neuroprotektynne właściwości CDP-choliny wydają się być związane z wpływem na zależne od glutaminianu uszkodzenia ekscytotoksyczne [48]. Citicolina może zmniejszać stężenie pozakomórkowe glutaminianu w mechanizmie hamowania wyrzutu glutaminianu przez komórki neuronalne i nasilania wychwytu glutaminianu przez astrocyty. Wydaje się, że neuroprotektyny efekt działania citicoliny może być związany z obniżonym poziomem glutaminianu pozakomórkowego, a także z jej wpływem na stabilność błon komórkowych [49, 50, 51].

Prezentowane badania wykazały, że efekt neuroprotektyny tej substancji związany jest z hamowaniem indukowanej przez glutaminian apoptotycznej śmierci komórki.

(3) Nagańska E, Taraszewska A, Matyja E, Grieb P, Rafałowska J. Neuroprotective effect of erythropoietin in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model in vitro. Ultrastructural study. Folia Neuropathol. 2010; 48(1):35-44.

Kolejną badaną substancją o potencjalnym wpływie neuroprotekcijnym była erytropoetyna.

Erytropoetyna jest hormonem występującym w różnych układach w organizmie, również w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym [52]. W ciągu ostatnich lat podkreślano jej rolę jako cytokiny, biorącej udział w wielu procesach fizjologicznych [53]. Wiele danych wskazuje, że erytropoetyna chroni komórki neuronalne w modelach uszkodzenia mózgu *in vitro* oraz *in vivo*, niezależnie od jej właściwości erytropoetycznych w szpiku [54, 55]. Erytropoetyna działa jako antagonistą cytotoksycznego działania glutaminianu [56], nasila ekspresję enzymów antyoksydacyjnych, redukuje wskaźnik wytwarzania wolnych rodników tlenowych i wywiera wpływ na uwalnianie neurotransmiterów. Działa pośrednio przez utrzymanie przepływu krwi lub bezpośrednio przez aktywację cząsteczek transportowych w neuronach.

Celem prezentowanych badań była ocena wpływu erytropoetyny na cechy ultrastrukturalne motoneuronów w modelu hodowli organotypowych rdzenia kręgowego szczura, poddanego ekspozycji na specyficzny bloker wychwytu glutaminianu - DL-threo-beta-hydroxyaspartate (THA), po wcześniejszym podaniu do medium erytropoetyny.

Badania ultrastrukturalne wykazały, że hodowle rdzenia kręgowego w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności po podaniu erytropoetyny wykazywały mniej nasilone uszkodzenia neuronalne. Hodowle rdzenia poddane ekspozycji wyłącznie na EPO wykazywały obecność motoneuronów, zawierających dość dobrze zachowane perykariony i wypustki komórkowe. Po 3-7 dniach ekspozycji na THA występowały liczne uszkodzone motoneurony, wykazujące głównie ultrastrukturalne cechy martwiczej i apoptotycznej śmierci komórkowej. W okresie późniejszym, po 7-9 dniach ekspozycji na THA, niektóre motoneurony wykazywały degeneracyjne zmiany o cechach autofagii. Hodowle poddane ekspozycji na THA po wcześniejszym podaniu EPO sporadycznie zawierały uszkodzone motoneurony we wczesnych fazach obserwacji. Wiele motoneuronów wykazywało prawidłową strukturę jądra i regularną organizację długich kanałów siateczki endoplazmatycznej. Większość

komórek glejowych i wypustek komórkowych w neuropilu pozostawała dobrze zachowana. Wyjątkowo obserwowano znacznego stopnia obrzmienie cytoplazmy i/lub martwicze lub autofagiczne cechy uszkodzenia. Po 7-9 dniach po ekspozycji na EPO + THA występowały zmiany martwicze w wypustkach postsynaptycznych, zdecydowanie częściej niż we wcześniejszych okresach obserwacji. Jednak w tym samym czasie wiele motoneuronów wykazywało niezmienną ultrastrukturę. Natomiast nie obserwowano w neuronach cech ultrastrukturalnych charakterystycznych dla zmian apoptotycznych w czasie całego okresu obserwacji.

Podsumowanie: Prezentowane wyniki dokumentują wpływ neuroprotektyny EPO w modelu doświadczalnym przewlekłej ekscytotoksyczności, głównie w odniesieniu do zapobiegania występowaniu apoptozy w komórkach neuronalnych. Nasze wyniki, jak również dane pochodzące z wcześniejszych doniesień sugerują, że EPO może być obiecującym czynnikiem terapeutycznym w różnych stanach patologicznych, w tym ALS.

(1) Nagańska E, Matyja E, Taraszewska A, Rafałowska J. Protective effect of valproic acid on cultured motor neurons under glutamate excitotoxic conditions. Ultrastructural study. Folia Neuropathol 2015; 53 (4): 309-316.

Kolejną substancją, badaną, w aspekcie jej neuroprotektynnego działania wobec motoneuronów w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności glutaminianowej (GLU), był kwas walproinowy

Korzystny efekt działania kwasu walproinowego był wykazywany w wielu eksperymentalnych modelach chorób neurodegeneracyjnych. Szczegółowy mechanizm, leżący u podłoża korzystnych efektów działania VPA, jest złożony [57], ale ostatnio podkreśla się związek z bezpośrednim hamowaniem deacetylazy histonowej (ang. *histone deacetylase*, HDAC). [58, 59] Ostatnie sugestie dotyczą potencjalnej roli procesów acetylacji i deacetylacji w patogenezie różnych chorób neurologicznych, w tym ALS [60]. Publikowane są doniesienia, dotyczące roli obniżonego poziomu acetylacji histonów w procesie degeneracji motoneuronów w eksperymentalnych modelach ALS [61]. Obniżona ekspresja deacetylazy histonowej 6 (HDAC6) była obserwowana we wczesnych i zaawansowanych stadiach ALS w modelu mysim [62]. Wydaje się więc, że hamowanie deacetylazy histonowej może być obiecującą strategią terapeutyczną w różnych chorobach

neurodegeneracyjnych, w tym chorobach neuronu ruchowego (MND) [63, 64]. Acetylacja i deacetylacja białek histonowych odgrywa ważną rolę w różnych procesach wewnątrzkomórkowych, również w regulacji procesu transkrypcji [65].

Kwas walproinowy (VPA; 2-n-propylpentanoic acid) wykazuje korzystny wpływ na przeżycie komórek neuronalnych i plastyczność synaptyczną na drodze bezpośredniego wpływu na neurony i pośredniego wpływu przez komórki glejowe [59]. VPA jest substratem szlaku β -oksydacji kwasów tłuszczowych, zachodzącego głównie w mitochondriach. Sugerowano również, że VPA wzmacnia działanie neuroprotekcjne przez wpływ na różne szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego, łącznie z regulacją funkcji białka Bcl-2 w aspekcie działania antyapoptotycznego [66].

W hodowlach rdzenia kręgowego, poddanych ekspozycji na działanie GLU, obserwowano spektrum zaawansowanych zmian degeneracyjnych w motoneuronach i cechy destrukcji w wypustkach neuronalnych otaczającego neuropilu. Stosowanie VPA skutecznie zapobiegało występowaniu zmian degeneracyjnych, indukowanych ekspozycją na działanie glutaminianu. Po 3, 6 i 11 dniach po jednoczesnym stosowaniu VPA i GLU obserwowano liczne, dobrze zachowane duże motoneurony. Po 3 dniach ekspozycji na VPA + GLU neurony wykazywały cytoplazmę bogatą w długie kanały szorstkiej siateczki endoplazmatycznej i dobrze zachowany aparat Golgiego. Sporadycznie obserwowano niewielkie obrzmienie mitochondriów oraz obecność drobnych wakuoli autofagicznych. Dość dobrze zachowane motoneurony, zawierające duże jądro z rozproszoną chromatyną i wyróżnionym jąderkiem, występowały nawet po 6 i 11 dniach ekspozycji na VPA + GLU. Neuropil zawierał niezmienione wypustki neuronalne i glejowe. Niektóre duże motoneurony wykazywały jedynie niewielkiego stopnia uszkodzenie mitochondriów, ogniskową wakuolizację cytoplazmy i nieliczne wakuole autofagiczne. Motoneurony z cechami zmian apoptotycznych lub degeneracji autofagicznej obserwowano sporadycznie.

Podsumowanie: Wyniki przeprowadzonych badań ultrastrukturalnych podkreślają neuroprotekcijną skuteczność VPA w eksperymentalnym modelu neurodegeneracji, związanej z procesem ekscytotoksyczności glutaminianu *in vitro*. Prewencja ekscytotoksycznych zmian neuronalnych *in vitro* związana była z hamowaniem apoptozy i autofagii. Hodowle poddane działaniu glutaminianu z kwasem walproinowym wykazywały obecność dobrze zachowanych kanałów szorstkiej siateczki endoplazmatycznej w motoneuronach w okresie 3-11 dni po ekspozycji. Otrzymane wyniki potwierdzają

poprzednie dane, wskazujące na neuroprotekcyny efekt działania kwasu walproinowego na drodze hamowania apoptozy w następstwie stresu oksydacyjnego.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW BADAŃ

Stwardnienie zanikowe boczne jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną, obejmującą uszkodzenie górnego i dolnego neuronu ruchowego. Nie ma skutecznego leku hamującego rozwój choroby, która w ciągu 5 lat od postawienia rozpoznania prowadzi do śmierci pacjenta. Od wielu lat prowadzone są szeroko zakrojone badania eksperymentalne i kliniczne, mające na celu zrozumienie patogenezy choroby oraz ustalenie potencjalnych strategii terapeutycznych.

Badania prowadzone w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności *in vitro*, przedstawione w ramach prezentowanego osiągnięcia habilitacyjnego, udokumentowały współistnienie różnych procesów neurozwyrodnieniowych w motoneuronach rdzenia kręgowego. Istotną obserwacją było wykazanie ciągłości zmian martwiczo-apoptotycznych i apoptotyczno-autofagicznych. Wyniki badań podkreślają również znaczącą rolę procesu autofagii w rozwoju uszkodzeń ekscytotoksycznych. Udokumentowano towarzyszące zmiany morfologiczne w komórkach astroglejowych, co potwierdza potencjalną rolę astrogleju w patogenezie postępującego procesu neurodegeneracyjnego. Przeprowadzone badania pozwalają na lepsze poznanie procesów neurodegeneracyjnych w warunkach przewlekłej ekspozycji na działanie glutaminianu. Jest to o tyle ważne, że ekscytotoksyczność glutaminianu uważana jest za podstawowy mechanizm patogenetyczny, leżący u podłoża ALS.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały neuroprotekcyny działanie CDP-choliny, erytropoetyny i kwasu walproinowego w stosunku do neuronów ruchowych rdzenia kręgowego w modelu ALS *in vitro*. CDP-cholina wywierała hamujący wpływ głównie w stosunku do zmian apoptotycznych, najprawdopodobniej w mechanizmie obniżania poziomu glutaminianu pozakomórkowego i stabilizacji błon komórkowych. Podobne działanie neuroprotekcyny, w postaci hamowania przede wszystkim zmian apoptotycznych w neuronach ruchowych, wykazywała erytropoetyna. Prewencja zmian neurodegeneracyjnych w motoneuronach rdzenia kręgowego pod wpływem działania

kwasy walproinowe widoczna była w postaci hamowania zmian apoptotycznych i autofagicznych.

Wyraźnie korzystny wpływ neuroprotekcyny badanych substancji w odniesieniu do zmian ultrastrukturalnych, obserwowanych w modelu ALS *in vitro*, nie ma jednoznacznego przełożenia na skuteczność terapeutyczną w warunkach klinicznych. Niemniej, wykazana neuroprotekcja uszkodzeń ekscytotoksycznych, wywołanych przedłużoną ekspozycją na działanie glutaminianu, stanowi podstawę do podejmowania kolejnych badań w tym zakresie.

PIŚMIENNICTWO:

1. Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 2006; 52: 39-59.
2. Van Damme P1, Dewil M, Robberecht W, Van Den Bosch L. Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis.* 2005;2(3-4):147-59.
3. Blasco H, Mavel S, Corcia P, Gordon PH1. The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr Med Chem.* 2014;21(31):3551-75.
4. Van Den Bosch L1, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Nov-Dec;1762(11-12):1068-82. Epub 2006 May 17.
5. Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 6591-6595.
6. Vucic S1, Rothstein JD2, Kiernan MC3. Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends Neurosci.* 2014 Aug;37(8):433-42. doi: 10.1016/j.tins.2014.05.006. Epub 2014 Jun 11.
7. (Miller RG1, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Mar 14;(3):CD001447.
8. Rowland LP. Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1998; 160 Suppl 1: S6-24.
9. Millecamps S1, Boillée S, Le Ber I, Seilhean D, Teyssou E, Giraudeau M, Moigneu C, Vandenberghe N, Danel-Brunaud V, Corcia P, Pradat PF, Le Forestier N, Lacomblez L,

- Bruneteau G, Camu W, Brice A, Cazeneuve C, Leguern E, Meininger V, Salachas F. Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes. *J Med Genet*. 2012 Apr;49(4):258-63. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100699.
10. Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Fergani A, Rene F, Meininger V, Loeffler JP, Dupuis L. Amyotrophic lateral sclerosis: all roads lead to Rome. *J Neurochem* 2007; 101: 1153-1160.
 11. Orsini M, Oliveira AB, Nascimento OJ, Reis CH, Leite MA, de Souza JA, Pupe C, de Souza OG, Bastos VH, de Freitas MR, Teixeira S, Bruno C, Davidovich E, Smidt B. Amyotrophic Lateral Sclerosis: New Perspectives and Update. *Neurol Int* 2015; 7: 5885.
 12. Paez-Colasante X, Figueroa-Romero C, Sakowski SA, Goutman SA, Feldman EL. Amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and therapeutics in the epigenomic era. *Nat Rev Neurol* 2015; 11: 266-279.
 13. Palomo GM, Manfredi G. Exploring new pathways of neurodegeneration in ALS: the role of mitochondria quality control. *Brain Res* 2015; 1607: 36-46.
 14. Przedborski S, Mitsumoto H, Rowland LP. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis research. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2003; 3: 70-77.
 15. Ravits J. Focality, stochasticity and neuroanatomic propagation in ALS pathogenesis. *Exp Neurol* 2014; 262 Pt B: 121-126.
 16. Kaur SJ1, McKeown SR2, Rashid S3. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*. 2016 Feb 15;577(2):109-18. doi: 10.1016/j.gene.2015.11.049. Epub 2015 Dec 2.
 17. Ticozzi N1, Ratti A, Silani V. Protein aggregation and defective RNA metabolism as mechanisms for motor neuron damage. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010 Jul;9(3):285-96.
 18. Mackenzie IR1, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H, Eisen A, McClusky L, Kretzschmar HA, Monoranu CM, Highley JR, Kirby J, Siddique T, Shaw PJ, Lee VM, Trojanowski JQ. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol*. 2007 May;61(5):427-34.
 19. Guerrero EN1, Wang H2, Mitra J2, Hegde PM2, Stowell SE3, Liachko NF4, Kraemer BC4, Garruto RM5, Rao KS6, Hegde ML7. TDP-43/FUS in motor neuron disease:

- Complexity and challenges. *Prog Neurobiol.* 2016 Oct - Nov;145-146:78-97. doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.09.004. Epub 2016 Sep 28.
20. Zou ZY, Zhou ZR, Che CH, Liu CY, He RL, Huang HP. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017 Jan 5. pii: jnnp-2016-315018. doi: 10.1136/jnnp-2016-315018.
 21. Kato S. Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008; 115: 97-114.
 22. Adamek D, Tomik B, Pichór A, Kałuża J, Szczudlik A. The heterogeneity of neuropathological changes in amyotrophic lateral sclerosis. A review of own autopsy material. *Folia Neuropathol* 2002; 40: 119-124.
 23. Cheah BC1, Vucic S, Krishnan AV, Kiernan MC. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Med Chem.* 2010;17(18):1942-199.
 24. Nefussy B1, Hirsch J, Cudkowicz ME, Drory VE. Gender-based effect of statins on functional decline in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2011 Jan 15;300(1-2):23-7. doi: 10.1016/j.jns.2010.10.011. Epub 2010 Nov 5.
 25. Kruminis-Kaszkiel E1, Wojtkiewicz J, Maksymowicz W. Glial-restricted precursors as potential candidates for ALS cell-replacement therapy. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2014;74(3):233-41.
 26. Shaw PJ. Excitatory amino acid receptors, excitotoxicity, and the human nervous system. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993; 6: 414-422.
 27. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 2000; 130: 1007S-1015S
 28. Kanai Y. Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 565-572.
 29. Gadea A, Lopez-Colome AM. Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. *J Neurosci Res* 2001; 63: 453-460.
 30. Griffiths R, Dunlop J, Gorman A, Senior J, Grieve A. L-transpyrrolidine-2,4-dicarboxylate and cis-1-aminocyclobutane-1,3dicarboxylate behave as transportable, competitive inhibitors of the high-affinity glutamate transporters. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 267-274.
 31. Kiriya Y, Nochi H. The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2015 Nov 9;16(11):26797-812. doi: 10.3390/ijms161125990.

32. Son JH¹, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*. 2012 Feb 29;44(2):89-98. doi: 10.3858/emm.2012.44.2.031.
33. Lossi L1, Castagna C, Merighi A. Neuronal cell death: an overview of its different forms in central and peripheral neurons. *Methods Mol Biol*. 2015;1254:1-18. doi: 10.1007/978-1-4939-2152-2.
34. Majno G., Joris I. (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol*. 146:3–15.
35. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239–257)
36. Levine B and Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005, 115: 2679–2688.
37. Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 2004, 14: 70–77.
38. Pasquali L1, Longone P, Isidoro C, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F. Autophagy, lithium, and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*. 2009 Aug;40(2):173-94. doi: 10.1002/mus.21423.
39. Pasquali L1, Ruffoli R, Fulceri F, Pietracupa S, Siciliano G, Paparelli A, Fornai F. The role of autophagy: what can be learned from the genetic forms of amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010 Jul;9(3):268-78.)
40. Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estevez AG, Beckman JS. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 47: 263-274.
41. Rothstein JD. Excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol* 1995; 68: 7-20. 36.
42. Sasaki S, Komori T, Iwata M. Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000; 100: 138-144.
43. Trotti D, Danbolt NC, Volterra A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 328-334.
44. Anneser JM, Cookson MR, Ince PG, Shaw PJ, Borasio GD. Glial cells of the spinal cord and subcortical white matter upregulate neuronal nitric oxide synthase in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2001; 171: 418-421.

45. Cakir E, Usul H, Peksoylu B, Sayin OC, Alver A, Topbas M, Baykal S, Kuzeyli K. Effects of citicoline on experimental spinal cord injury. *J Clin Neurosci* 2005; 12: 923-926.
46. Conant R, Schauss AG. Therapeutic applications of citicoline for stroke and cognitive dysfunction in the elderly: a review of the literature. *Altern Med Rev* 2004; 9: 17-31.
47. Yucel N, Cayli SR, Ates O, Karadag N, Firat S, Turkoz Y. Evaluation of the neuroprotective effects of citicoline after experimental spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery. *Neurochem Res Epub* 2006; 31: 767-775.
48. Secades JJ, Lorenzo JL. Citicoline: pharmacological and clinical review, 2006 update. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006; 28 Suppl B: 1-56.
49. López G-Coviella I, Agut J, Ortiz JA, Wurtman RJ. Effects of orally administered cytidine 5'-diphosphate choline on brain phospholipid content. *J Nutr Biochem* 1992; 3: 313-315.
50. Trovarelli G, de Medio GE, Dorman RV, Piccinin GL, Horrocks LA, Porcellati G. Effect of cytidine diphosphate choline (CDP-choline) on ischemia-induced alterations of brain lipid in the gerbil. *Neurochem Res* 1981; 6: 821-833.
51. Zweifler RM. Membrane stabilizer: citicoline. *Curr Med Res Opin* 2002; 18 Suppl 2: 14-17
52. Campana WM, Myers RR. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB J* 2001; 15: 1804-1806.
53. Sasaki R. Pleiotropic functions of erythropoietin. *Intern Med* 2003; 42: 142-149.
54. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10526-10531.
55. Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4044-4049.
56. Morishita E, Maruda S, Nagao M, Yasuda Y. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997; 76: 105-116. 26
57. Wang X, Ma M, Teng J, Che X, Zhang W, Feng S, Zhou S, Zhang Y, Wu E, Ding X. Valproate Attenuates 25-kDa C-Terminal Fragment of TDP-43-Induced Neuronal

- Toxicity via Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress and Activating Autophagy. *Int J Biol Sci.* 2015 May 19;11(7):752-61. doi: 10.7150/ijbs.11880.
58. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giava- ra S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001; 20: 6969-6978.
59. Monti B, Polazzi E, Contestabile A. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. *Curr Mol Pharmacol* 2009; 2: 95-109.
60. Liu D, Liu C, Li J, Azadzi K, Yang Y, Fei Z, Dou K, Kowall NW, Choi HP, Vieira F, Yang JH. Proteomic analysis reveals differentially regulated protein acetylation in human amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *PLoS One* 2013; 8: e80779.
61. Janssen C, Schmalbach S, Boeselt S, Sarlette A, Dengler R, Petri S. Differential histone deacetylase mRNA expression patterns in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69: 573-581.
62. . Chen S, Zhang XJ, Li LX, Wang Y, Zhong RJ, Le W. Histone deacetylase 6 delays motor neuron degeneration by ameliorating the autophagic flux defect in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Bull* 2015; 31: 459-468.
63. Chuang DM, Leng Y, Marinova Z, Kim HJ, Chiu CT. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci* 2009; 32: 591-601.
64. Echaniz-Laguna A, Bousiges O, Loeffler JP, Boutillier AL. Histone deacetylase inhibitors: therapeutic agents and research tools for deciphering motor neuron diseases. *Curr Med Chem* 2008; 15: 1263-1273.
65. Verdone L, Caserta M, Di Mauro E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol* 2005; 83: 344-353.
66. Rouaux C, Panteleeva I, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Dupuis L, Menger Y, Boutillier AL, Loeffler JP. Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neurosci* 2007; 27: 5535-5545.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych) z wykazem opublikowanych prac naukowych i twórczych prac zawodowych.

Poza publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia habilitacyjnego, ukazało się szereg prac, których jestem autorem lub współautorem. Są to zarówno prace oryginalne, kazuistyczne, jak i pogłądowe, dotyczące neuropatologii oraz aspektów klinicznych chorób neurologicznych, przede wszystkim z zakresu epileptologii.

Sumaryczny IF wszystkich publikacji wg. JCR, wynosi 23,706; sumaryczna punktacja MNiSW – 393; w tym:

- przed doktoratem: **IF – 3,957; MNiSW – 67**
- po doktoracie: **IF – 19,749; MNiSW - 326**

Wyniki analizy bibliometrycznej przeprowadzonej w Bibliotece Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w dniu 10.07.2017r w oparciu o internetową bazę cytowań Web of Science Core Collection oraz bazę JCR (Journal Citation Reports) wykazały:

- całkowita liczba cytowań – 291, w tym:
 - liczba cytowań prac powstałych przed doktoratem – 50
 - liczba cytowań prac powstałych po doktoracie 241
- całkowita liczba cytowań bez autocytowań – 271, w tym:
 - liczba cytowań prac powstałych przed doktoratem – 49
 - liczba cytowań prac powstałych po doktoracie - 227
- cytowań bez autocytowań. Indeks Hirscha o wartości 10

Wartość indeksu Hirscha dla całego dorobku – 11

Wartość indeksu Hirscha za prace powstałe przed doktoratem – 4

W bazie Scopus wartość indeksu Hirscha dla całego dorobku wynosi - 10

I/ Działalność naukowo-badawcza

Pracę naukową rozpocząłam w 1998 roku w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, gdzie pod kierunkiem Pani Profesor Ewy Matyi uczestniczyłam w pracach z zakresu **neuropatologii** doświadczalnej i klinicznej.

Prowadziłam prace badawcze na hodowlach organotypowych hipokampa szczura, szczególnie na modelu anoksji In vitro. Badałam uszkodzenia anoksyjne komórek

piramidowych hipokampa oraz efekt neuroprotekcyny jonów cynku na uszkodzenia poanoksyjne. Podsumowaniem cyklu badań w tym zakresie była rozprawa doktorska (2004) pt.: "Wpływ jonów cynku na nasilenie wczesnych i późnych uszkodzeń komórek nerwowych hipokampa szczura w modelu anoksji in vitro", której promotorem była Prof. dr hab. n. med. Ewa Matyja, oraz publikacje/doniesienia zjazdowe. Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Anoksja w warunkach in vitro wywołuje różnorodne zmiany ultrastrukturalne w neuronach piramidowych hipokampa, obejmujące zmiany typowe zarówno dla procesu martwicy, apoptozy jak i zmiany pośrednie łączące cechy uszkodzeń apoptotycznych i martwiczych. Tak zróżnicowany obraz zmian morfologicznych potwierdza istnienie ciągłości procesów apoptotyczno-martwiczych w warunkach niedotlenienia.
2. Nasilone zmiany mitochondrialne w neuronach hipokampa in vitro po podaniu mikromolarnych stężeń $ZnCl_2$ (100-500 μ M) sugerują, że zwiększenie przepuszczalności błon mitochondrialnych odgrywa istotną rolę w neurotoksycznym działaniu jonów cynku.
3. $ZnCl_2$ w stężeniu 100 μ M zmniejsza nasilenie uszkodzeń komórek nerwowych hipokampa w modelu anoksji in vitro. Efekt neuroprotekcyny cynku, zaznaczony szczególnie w stosunku do zmian apoptotycznych, świadczy o modulacyjnym działaniu jonów cynku na proces apoptozy w warunkach niedotlenienia.
4. Zmniejszenie stężenia wewnątrzkomórkowego jonów cynku, poprzez podanie związku kompleksującego o silnym powinowactwie do cynku (TPENU), powoduje nasilenie apoptotycznych uszkodzeń poanoksyjnych w neuronach piramidowych hipokampa, co należy wiązać z brakiem neuroprotekcynnego działania endogenego cynku.
5. Wzrost ekspresji białek proapoptotycznych (p53 i BAX) zaznaczony najsilniej w hodowlach poddanych anoksji przy jednoczesnym podaniu związku chelatującego cynk (TPENU) potwierdza udział procesu apoptozy w patogenezie uszkodzeń niedotlenieniowych w warunkach zmniejszonej puli endogenego cynku.
6. Nadekspresja białka antyapoptotycznego BCL-2, zaznaczona w modelu anoksji in vitro, przy jednoczesnym podaniu egzogenego cynku dokumentuje regulatorową rolę jonów cynku w stosunku do procesu apoptozy oraz podkreśla znaczenie białka BCL-2 w przeżyciu neuronów po uszkodzeniach anoksyjnych.

Uzyskane wyniki wskazują, że neuroprotekcyjne stężenia jonów cynku zawierają się w wąskim przedziale wartości, powyżej i poniżej których może dochodzić do aktywacji procesu apoptozy. Badania przeprowadzone w modelu hodowli tkankowej stanowią jeden z istotnych etapów w badaniach eksperymentalnych nad ewentualnym zastosowaniem preparatów cynku w warunkach klinicznych.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w pracach opublikowanych przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora nauk medycznych:

1. **Naganska E**, Matyja E. Ultrastructural characteristics of necrotic and apoptotic mode of neuronal cell death in a model of anoxia *in vitro*. *Folia Neuropathol.* 2001;39(3):129-39.
2. **Naganska E**, Matyja E. The protective effect of ZnCl₂ pretreatment on the development of postanoxic neuronal damage in organotypic rat hippocampal cultures. *Ultrastruct Pathol.* 2002 Nov-Dec;26(6):383-91.

Dwie kolejne publikacje, dotyczące ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych w modelu anoksji *in vitro* oraz zmian apoptotycznych po podaniu chelatora cynku zostały przedstawione w pracach opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora:

1. **Naganska E**, Matyja E. Expression of apoptosis-related proteins in model of anoxia *in vitro*. *Folia Neuropathol.* 2005;43(1):23-9.
2. **Naganska E**, Matyja E. Apoptotic neuronal changes enhanced by zinc chelator--TPEN in organotypic rat hippocampal cultures exposed to anoxia. *Folia Neuropathol.* 2006;44(2):125-32.

II/ W ramach głównego nurtu badań morfologicznych, prowadzonych w Zakładzie Neuropatologii, włączyłam się w badania z zakresu neuropatologii klinicznej. Uczestniczyłam i nadal biorę udział w ocenie histopatologicznej, immunohistochemicznej i ultrastrukturalnej wybranych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, będących przedmiotem opracowań kliniczno-patomorfologicznych. Brałam udział w opracowaniu morfologicznym materiału z rzadkich guzów ośrodkowego układu nerwowego, takich jak nerwiaki, oponiaki, guzy oligodendroglejowe, PXA, guzy okolicy siodła tureckiego i innych,

których cechy histopatologiczne, lokalizacja lub przebieg kliniczny wyraźnie odbiegały od typowej dla nich charakterystyki. Opracowania te stały się przedmiotem licznych publikacji oraz doniesień konferencyjnych. Opisane obrazy histopatologiczne rzadkich nowotworów OUN (DNT, AG, GG) oraz ustalone korelacje kliniczno-morfologiczne mogą pozwolić na dopracowanie algorytmu diagnostycznego oraz doboru odpowiednich terapii.

1. **Naganska E**, Matyja E, Mossakowski Z, Zabek M. Giant cervico-thoracic schwannoma with long clinical history. Case report. *Folia Neuropathol.* 1999;37(3):185-8.

Opisano wyjątkowy przypadek pacjentki z rozpoznaniem olbrzymiego nerwiaka z cechami histopatologicznymi Antoni A i Antoni B, o długości 12 cm, obejmującego przestrzeń od C4/C5 do Th4. Niespecyficzne objawy kliniczne, trwające 14 lat, były powodem opóźnienia rozpoznania i leczenia chirurgicznego.

2. **Naganska E**, Matyja E, Zabek M, Jagielski J. Disseminated spinal and cerebral ependymoma with unusual histological pattern: clinicopathological study of a case with retrograde tumor spread. *Folia Neuropathol.* 2000;38(3):135-41.

Opisano szczególny przypadek zmian przerzutowych anaplastycznego wyściółczaka wywodzącego się z kanału centralnego w dolnym odcinku lędźwiowym rdzenia kręgowego. Rozsiew komórek nowotworowych „ku górze” drogą płynu mózgowo-rdzeniowego powodował występowanie zmian przerzutowych w górnych odcinkach rdzenia kręgowego i mózgu.

3. Matyja E, Taraszewska A, **Naganska E**, Zabek M. Phenotypic characteristics of GFAP-positive oligodendroglial tumours. Part II: ultrastructural study. *Folia Neuropathol.* 2001;39(2):103-10.

Obserwacje w mikroskopie elektronowym struktury GFAP-dodatnich guzów oligodendroglejowych podtrzymują opinie o występowaniu heterogennej populacji komórek nowotworowych z obecnością typów przejściowych między komórkami oligodendroglejowymi i astroglejowymi.

4. Matyja E, **Naganska E**, Zabek M, Koziara H. Myxopapillary ependymoma of the lateral ventricle with local recurrences: histopathological and ultrastructural analysis of a case. *Folia Neuropathol.* 2003;41(1):51-7.

Przedmiotem opracowania był niezwykle rzadki przypadek nawracającego wewnątrzczaszkowego wyściółczaka śluzowobrodawkowatego, pochodzącego z komórek wyściółki komory bocznej. Tego typu guzy są zwykle lokalizowane w obrębie ogona końskiego i nici końcowej.

5. Matyja E, Kroh H, Taraszewska A, **Naganska E**, Zabek M, Marchel A. Expression of macrophage/histiocytic antigens in pleomorphic xanthoastrocytomas. *Folia Neuropathol.* 2003;41(2):89-95.

W pracy przedstawiono wyniki badań immunohistochemicznych dotyczących guzów o typie żółtakogwiaździaka pleomorficznego - pleomorphic xanthoastrocytoma. Badania wykazały zróżnicowanie ekspresji antygenów charakteryzujących komórki glejowe oraz antygenów makrofagowo/histiocytarnych (LCA, CD68, HLA-klasa II, MAC 387). Uzyskane wyniki dokumentują immunofenotypową heterogenność komórek nowotworowych PXA.

6. Matyja E, **Naganska E**, Gorski R, Zabek M. Multiple brain metastases from malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST). *Folia Neuropathol.* 2004;42(1):43-8.

Przedstawiono wyjątkowy przypadek złośliwego MPNST dającego wielokrotne lokalne wznowy guza oraz zmiany przerzutowe w obrębie mózgu, tarczycy oraz nadnerczy.

7. Matyja E, **Naganska E**, Zabek M, Jagielski J. Meningioma with the unique coexistence of secretory and lipomatous components: a case report with immunohistochemical and ultrastructural study. *Clin Neuropathol.* 2005 Nov-Dec;24(6):257-61.

Przedmiotem pracy był wyjątkowo rzadko spotykany wariant współistnienia dwóch różnych podtypów histologicznych oponiaka w obrębie jednego guza. Badania histopatologiczne wykazały obecność komórek wydzielniczych oponiaka, związanych z nasilonym komponentem tłuszczowym.

8. Matyja E, **Naganska E**. History and nature of pseudopsammoma bodies. *Clin Neuropathol.* 2006 Jul-Aug;25(4):204.

9. Kowalska M, **Nagańska E**, Fiszer U. Difficulties in the diagnosis of the first symptoms of brain tumors prehospital delay diagnosis. *Pol Merkur Lekarski.* 2012; 33: 317-21.

W pracy przedstawiono trudności związane z odroczeniem rozpoznania nowotworów ośrodkowego układu nerwowego w przypadku występowania niespecyficznych objawów klinicznych.

10. **Nagańska E**, Matyja E, Pucko E, Ząbek M. The coexistence of pleomorphic xanthoastrocytoma and arteriovenous malformation. A case report. *Folia Neuropathol.* 2013; 51: 269-274.

Opisano niezwykle rzadkie współistnienie pleomorficznego żółtakogwiaździaka z malformacją naczyniową typu tętniczo-żylnego. PXA jest rzadkim guzem astroglejowym, wywodzącym się z astrocytów podoponowych, podczas gdy AVM należy do wrodzonych zaburzeń rozwojowych naczyń. Patogeneza takiej koegzystencji pozostaje niewyjaśniona.

11. Matyja E, Maksymowicz M, Grajkowska W, Zieliński G, Kunicki J, Bonicki B, Witek P, **Naganska E**. Ganglion cell tumours in the sella turcica in close morphological connection with pituitary adenomas. *Folia Neuropathol.* 2015; 53: 203-18.

Opracowano korelacje kliniczno-patomorfologiczne guzów komórek zwojowych rejonu siodła tureckiego. Udokumentowano częste współistnienie zwojaka ze skąpoziarnistym gruczolakiem somatotropowym przysadki oraz ściśle powiązanie morfologiczne elementów neuronalnych i gruczołowych. Korelacje kliniczno-patomorfologiczne w przypadkach guzów komórek zwojowych rejonu siodła tureckiego są ważnym elementem procesu diagnostyczno-terapeutycznego.

12. Matyja E, Grajkowska W, Stępień K, **Naganska E**. Heterogeneity of histopathological presentation of pilocytic astrocytoma - diagnostic pitfalls. A review. *Folia Neuropathol.* 2016;54(3):197-211.

Prezentowano charakterystykę kliniczno-patomorfologiczną gwiaździaka włosowato-komórkowego oraz dylematy diagnostyczne związane z heterogennym utkaniem nowotworu. Podkreślono konieczność wnikliwej oceny i analizy objawów klinicznych, histopatologicznych i molekularnych guzów pilocytarnych, aby uniknąć błędnych rozpoznań histopatologicznych.

III/ W ramach pracy klinicznej na etacie starszego asystenta w Oddziale Klinicznym Neurologii i Epileptologii SPSK im. Prof. W. Orłowskiego CMKP w Warszawie, od 2004r zaangażowałam się w działalność dydaktyczno-naukową z zakresu neurologii. Od początku, szczególne miejsce wśród moich zainteresowań zajmuje epileptologia, w tym diagnostyka, różnicowanie oraz leczenie incydentów napadowych pierwotnie i wtórnie mózgowych, przede wszystkim padaczki, zwłaszcza padaczki lekoopornej i stanów padaczkowych. Badania obejmują różne grupy pacjentów, z uwzględnieniem kobiet planujących ciążę i kobiet ciężarnych oraz osób w starszym wieku. W ramach codziennej praktyki klinicznej opisuję zapisy EEG oraz badania wideometryczne. Wieloletnia praca kliniczna i leczenie pacjentów z padaczką zaowocowały współautorstwem w szeregu prac poglądowych, kazuistycznych oraz materiałów dydaktycznych na temat różnych aspektów epileptologii przede wszystkim diagnostyki różnicowej napadów padaczkowych, leczenia, oceny objawów niepożądanych stosowanych leków, prowadzenia opieki przewlekłej nad pacjentami z padaczką. Wyniki badań klinicznych, obserwacji i codziennych doświadczeń znalazły się w publikacjach oraz były prezentowane na konferencjach naukowych:

1. Grabowska-Grzyb A, **Naganska E**, Lechowicz W, Jedrzejczak J, Fiszer U. Description of mood disorder in patients with epilepsy. Pol Merkur Lekarski. 2004 Apr;16(94):337-9. Polish.
2. Grabowska-Grzyb A, Jedrzejczak J, **Naganska E**, Fiszer U. Risk factors for depression in patients with epilepsy. Epilepsy Behav. 2006 Mar;8(2):411-7.

Występowanie depresji innych zaburzeń afektywnych u pacjentów z padaczką jest istotnym problemem klinicznym, dotyczy 40-75% chorych w tej grupie. Wiąże się z wyższym ryzykiem prób samobójczych i samobójstw. W badaniu wykazano znaczącą statystycznie korelację występowania zaburzeń afektywnych w przypadku różnych napadów padaczkowych z wyraźną dodatnią korelacją w przypadku napadów z płata skroniowego.

3. Grabowska-Grzyb A, **Naganska E**, Wolanczyk T. Hypersexuality in two patients with epilepsy treated with lamotrigine. Epilepsy Behav. 2006 May;8(3):663-5.

W leczeniu padaczki są stosowane coraz częściej leki nowej generacji, których skuteczność jest porównywalna do leków klasycznych natomiast profil bezpieczeństwa i tolerancji zdecydowanie korzystniejszy. W pracy opisano występowanie objawów niepożądanych w

postaci zaburzeń hiperseksualnych u pacjentów stosujących lamotryginę. Mechanizm tych zaburzeń nie jest jasny.

Niezwykle istotnym tematem prac klinicznych było opracowanie wyników badania PET-CT w diagnostyce padaczki lekoopornej. Badania były prowadzone we współpracy z Panem Profesorem Leszkiem Królickim w Zakładzie Medycyny Nuklearnej SPCSK AM w Warszawie. W grupie pacjentów pozostających pod opieką Punktu Konsultacyjnego przy Oddziale Klinicznym Neurologii i Epileptologii SPSK CMKP w Warszawie, u których rozpoznawano wieloletnią padaczkę lekooporną pod postacią napadów ogniskowych, przeprowadzono PET –CT w celu lokalizacji ogniska padaczkorodnego. Wyniki badań oraz omówienie znaczenia badania PET-CT w diagnostyce różnicowej incydentów napadowych zostały opublikowane w pracach:

4. **Nagańska E.** Znaczenie badania pozytonowej tomografii emisyjnej w diagnostyce padaczki. *Postępy Nauk Medycznych.* 2013; 10: 701-705.
5. Kubiak Balcerewicz K., Fiszer U., **Nagańska E.**, Siemianowski C., Sobieszek A., Witak-Grzybowska A., Kosińska-Szot A.: Differentiating stroke and seizure in acute setting - perfusion computed tomography? *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.* 2017;26(6):1321-1327.

Kolejne prace zawierały omówienie zasad postępowania z pacjentką chorą na padaczkę i planującą ciążę, w kontekście potencjalnego teratogennego wpływu stosowanych klasycznych, nowych i leków przeciwpadaczkowych najnowszej generacji. W pracach uwzględniłam aktualne wyniki międzynarodowych rejestrów dotyczących padaczki i ciąży oraz dane statystyczne pochodzące z opracowań międzynarodowych w porównaniu z danymi dotyczącymi pacjentek polskich. Niezwykle ważnym elementem właściwego prowadzenia leczenia przeciwpadaczkowego jest znajomość złożonego procesu współistniejących z padaczką innych chorób wymagających leczenia farmakologicznego. Dotyczy to przede wszystkim pacjentów w wieku podeszłym, ale także współistnienia padaczki i chorób nowotworowych ośrodkowego układu nerwowego. Wyniki moich obserwacji oraz doświadczeń z praktyki lekarskiej były opublikowane w pracach:

6. **Nagańska E.** Wpływ konwencjonalnych leków przeciwpadaczkowych na płód matki chorej na padaczkę. *Neurologia Po Dyplomie.* 2007; 1:19-21.
7. **Nagańska E.** Padaczka w chorobach nowotworowych mózgu. *Przewodnik Lekarza.* 2008; 5:25-29.

8. **Nagańska E.** Leki przeciwpadaczkowe – oczekiwania i rzeczywistość. *Terapia*. 2010; 29-33.
9. **Nagańska E.** Teratogeny wpływ leków przeciwpadaczkowych. *Polski Przegląd Neurologiczny*, 2012; 8(3), 129-135.
10. **Nagańska E.** Standardy leczenia padaczki. *Świat Medycyny i Farmacji*, 2013; 3:18-24.
11. Majkowska-Zwolińska B, Błaszczuk B, **Nagańska E**, Rysz A. Lakoamid – pierwsze doświadczenia u chorych na padaczkę w Polsce. *Neurologia Praktyczna* 2015; 1: 16-28.

IV/ W ciągu kolejnych lat pracy klinicznej miałam możliwość prowadzenia nie tylko codziennej opieki nad pacjentami hospitalizowanymi w trybie ostrym lub planowym w Oddziale Klinicznym Neurologii i Epileptologii SPSK im. Prof. w. Orłowskiego CMKP pod kierunkiem Pani Prof. dr n. med. Urszuli Fiszer, ale również pracy naukowej i dydaktycznej. Efektem mojej pracy są publikacje poglądowe, rozdziały w książkach oraz prezentacje doniesień w ramach konferencji naukowo-dydaktycznych, obejmujące szerokie spektrum zagadnień dotyczących diagnostyki i leczenia chorób neurologicznych, między innymi: udarów mózgu, zespołów otępiennych, migreny, zaburzeń snu. Jestem autorem rozdziałów dotyczących chorób naczyniowych, mitochondrialnych oraz padaczki lekoopornej w książce: *Neurologia – analiza przypadków klinicznych*, 2014. Ponadto, we współpracy z Panią Prof. U. Fiszer, dr Hoffman-Zacharską, dr. Jurek, byłam zaangażowana w opisanie mutacji w genie PRRT2, jako przyczyny napadowych dyskinez kinezygennych u młodego mężczyzny z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku migreny.

Wyniki moich obserwacji oraz doświadczeń klinicznych zostały opublikowane w pracach:

1. **Nagańska E.** Objawy neurologiczne guzów mózgu. *Postępy Nauk Medycznych*. 2006; 3: 112-118.
2. **Nagańska E.** Powikłania neurologiczne po leczeniu onkologicznym. *Przewodnik lekarza*. 2007; 9:54-59.
4. **Nagańska E**, Dyttus-Cebulok K. Neuroonkologia. Rozdział w książce *Podstawy neurologii z opisami przypadków klinicznych*. 2010; 193-220.
5. **Nagańska E.** Tryptany w leczeniu migreny – preferencje pacjentów na podstawie analizy badań klinicznych. *Świat Medycyny i Farmacji*, 2013; 7:38-42.
6. **Nagańska E.** Postępowanie w zespołach otępiennych – naczyniowych, mieszanych i typu alzheimerowskiego. *Świat Medycyny i Farmacji*, 2013; 8:40-46.

7. **Nagańska E.** Rozdziały w książce: Neurologia – analiza przypadków klinicznych, 2014.
- a. Choroby naczyniowe mózgu
 - Udar niedokrwieny mózgu z krwawieniem śródmózgowym związanym z leczeniem trombolitycznym. 35-38.
 - b. Padaczka
 - Padaczka lekooporna w przebiegu zmiany ogniskowej w płacie czołowym. 67-70.
 - Padaczka lekooporna z ogniskiem padaczkorodnym w płacie skroniowym. 71-74.
 - Padaczka lekooporna w przebiegu naczyńniaka jamistego płata czołowego. 83-86.
 - Padaczka i wodogłowie normotensyjne. 87-90.
 - c. Varia
 - Choroba mitochondrialna. 215-220.
8. **Nagańska E.** Korzyści z zastosowania zolpidemu w leczeniu bezsenności. Świat Medycyny i Farmacji. 2015; 3:24-29.
9. **Nagańska E.** Sumatryptan w leczeniu migrenowych bólów głowy. Świat Medycyny i Farmacji. 2016; 1: 16-20.
10. **Nagańska E,** Fiszer U, Jurek M, Hoffman-Zacharska D. Mutacje w genie PRRT2 jako przyczyna napadowych dyskinez kinezygenicznych u młodego mężczyzny z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku migreny. Polski Przegląd Neurologiczny. 2016; 12(3):174-177.

V/ Dzięki współpracy z Panią dr Anną Raczkiewicz-Papierską z Kliniki Chorób Wewnętrznych i Reumatologii Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie miałam możliwość uczestniczenia w badaniach nad oceną zmian patologicznych w obrębie kręgosłupa u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Przeprowadzałam badanie neurologiczne u pacjentów zakwalifikowanych do różnych grup klinicznych. Przedmiotem badań była ocena występowania zmian zapalnych w obrębie stawów kręgosłupa szyjnego, zwłaszcza patologii stawu szczytowo-obrotowego u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów i ocena potencjalnej korelacji z objawami neurologicznymi. Wykazano znaczącą

statycznie korelację występowania przemijających objawów w postaci np. parestezji, zaburzeń widzenia ze stopniem uszkodzenia stawów w ocenie radiologicznej.

Wyniki obserwacji zostały uwzględnione w publikacjach oraz były zaprezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych:

1. Raczkiewicz-Papierska A, Tłustochowicz W, Bachta A, **Nagańska E**, Warczyńska A, Zagrodzka M, Dudek M, Ciechomska A. Prevalence and risk factors for upper cervical spine involvement in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2005, 64, Supp. III, 562. Abstracts EULAR 2005
2. Raczkiewicz-Papierska A, Bachta A, **Nagańska E**, Zagrodzka M, Skrobowska E, Dudek A, Tłustochowicz W. Czynniki predysponujące do wystąpienia zmian zapalnych i rozwoju niestabilności kręgosłupa szyjnego u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. *Reumatologia* 2006, 44; 1:34-40.
3. Raczkiewicz-Papierska A, Bachta A, **Nagańska E**, Zagrodzka M, Skrobowska E, Tłustochowicz M, Dudek A, Tłustochowicz W. Częstość występowania zmian zapalnych w odcinku szyjnym kręgosłupa u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów i rola badania neurologicznego w ich diagnostyce. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2006;CXVI, 4 (10): 938-946.
4. Raczkiewicz A, Bachta A, **Nagańska E**, Sułek M, Juskiewicz A, Tłustochowicz M. Zmiany w stawie szczytowo-obrotowym u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów – badanie obserwacyjne Atlanto-axial lesions in patients with rheumatoid arthritis – observational study *Reumatologia* 2010; 48, 5: 316–325.

Udział w międzynarodowych lub krajowych projektach badawczych:

Prowadzona przeze mnie działalność naukowo-badawcza częściowo związana była z projektami badawczymi, w których pełniłam funkcję wykonawcy:

W latach 2003-2008 uczestniczyłam w 2 projektach badawczych:

- 1/ 2003-2005 - **projekt badawczy KBN Nr 3PO5A12322** pt.: „Rola inhibitorów transportu glutaminianu w procesie zwyrodnieniowym motoneuronów rdzenia kręgowego *in vitro*” - wykonawca
- 2/ 2006-2008 - **projekt badawczy KBN Nr 2PO5A17429** pt.: „Wpływ wybranych czynników neuroprotektynowych na proces zwyrodnieniowy motoneuronów rdzenia

kręgowego w modelu przewlekłej ekscytotoksyczności glutaminianu *in vitro*.” - wykonawca

VI/ Działalność dydaktyczna i popularyzatorska

Moja działalność dydaktyczna (wykłady, seminaria) związana jest z pracą w Oddziale Klinicznym Neurologii i Epileptologii SPSK im. Prof. W. Orłowskiego CMKP w Warszawie. Od ponad 10 lat prowadzę wykłady i szkolenia, których adresatem są lekarze realizujący program kształcenia w zakresie neurologii i medycyny rodzinnej. Obowiązkowe i uzupełniające szkolenia podyplomowe są prowadzone w ramach kilkudniowych kursów przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego. Tematyka prowadzonych przeze mnie wykładów obejmuje zagadnienia z dziedziny epileptologii, neuroonkologii oraz neuropatologii.

Tytuły kursów prowadzonych w ramach szkoleń specjalizacyjnych:

1. **„Padaczka - etiologia, epidemiologia, postępy w diagnostyce i leczeniu, padaczki lekooporne, grupy specjalnej troski.”**

Wykłady w ramach tego kursu obejmują zagadnienia dotyczące przyczyn występowania napadów padaczkowych i rozwoju padaczki; częstości występowania poszczególnych typów napadów padaczkowych w poszczególnych grupach pacjentów w zależności od wieku, płci, chorób współistniejących. Znaczącym elementem wykładów są zagadnienia dotyczące postępowania w grupach pacjentów szczególnej troski, zwłaszcza kobiet w okresie rozrodczym oraz pacjentów w wieku podeszłym. Omawiam także zasady dotyczące leczenia pacjentów z padaczką lekooporną, z uwzględnieniem zasad racjonalnej politerapii. Szczególnie ważnym tematem jest omówienie ryzyka występowania, rozpoznawania różnych typów stanów padaczkowych, a także aktualnych wytycznych dotyczących postępowania w tych sytuacjach.

2. **„Postępy w neurologii”**

Treść wykładu na tym kursie obejmuje najnowsze zagadnienia dotyczące diagnostyki molekularnej i genetycznej guzów ośrodkowego układu nerwowego, głównie glejaków mózgu, z uwzględnieniem najnowszych metod leczenia.

3. **„Elektroencefalografia” – kurs podstawowy i zaawansowany**

Zakres prezentacji w ramach tych kursów obejmuje podstawowe zasady przeprowadzania badania elektroencefalograficznego z omówieniem koniecznej współpracy całego zespołu techników i lekarzy. Kolejne wykłady dotyczą interpretacji prawidłowego zapisu elektroencefalogramu oraz oceny rodzaju możliwych artefaktów wpływających na jakość zapisu, naukę umiejętnego ich rozpoznawania. Następnym etapem szkolenia w ramach kursu jest ocena zapisu patologicznego w różnych stanach chorobowych. Wykłady są ilustrowane prezentacją zapisów EEG, co daje możliwość dyskusji, prób samodzielnego interpretowania zapisów.

4. **„Onkologia w neurologii”**

Przedmiotem moich wykładów w ramach tego kursu jest omówienie podstawowych danych dotyczących epidemiologii, klasyfikacji oraz objawów klinicznych guzów ośrodkowego układu nerwowego z uwzględnieniem diagnostyki różnicowej objawów nietypowych. Wykłady są ilustrowane prezentacją przypadków klinicznych dających możliwość bezpośredniego uczestniczenia w dyskusji w czasie wykładu.

5. **„Wprowadzenie do specjalizacji w dziedzinie neurologii”**

Wykłady na kursie dla lekarzy specjalizujących się w zakresie medycyny rodzinnej obejmują zagadnienia dotyczące podstawowej diagnostyki, epidemiologii i leczenia guzów ośrodkowego układu nerwowego oraz podstawowych zasad postępowania z pacjentami z podejrzeniem padaczki z omówieniem zasad diagnostyki i leczenia tej choroby. Szczególną uwagę poświęcam objawom niespecyficznym, mogącym budzić wątpliwości diagnostyczne, oraz sytuacjom stanowiącym wskazanie do konsultacji ze specjalistą neurologiem.

6. **„Padaczka”**

Wykłady prezentowane w ramach tego kursu obejmują podstawowe zagadnienia dotyczące epidemiologii, diagnostyki i różnicowania typów napadów padaczkowych i stanów padaczkowych oraz podstawowych zasad postępowania u pacjentów z podejrzeniem padaczki, a także w ciągu kolejnych lat leczenia chorych na padaczkę, również pacjentów z padaczką lekooporną.

7. **„Choroby naczyniowe mózgu i rdzenia kręgowego”**

W ramach tego kursu prowadzę wykłady dotyczące współwystępowania napadów padaczkowych u pacjentów po przebytych incydentach naczyniopochodnych, po

udarach mózgu lub w przebiegu malformacji naczyniowych. Treść wykładu obejmuje zagadnienia postępowania terapeutycznego w przypadku napadów padaczkowych występujących w ostrej fazie udaru mózgu, a także w ciągu kolejnych lat po przebytych incydentach naczyniowych.

8. **„Leki przeciwpadaczkowe – oczekiwania i rzeczywistość”** w ramach konferencji **„Współczesna neurologia – konferencja dla ordynatorów i kierowników specjalizacji”** (2014)

Tematem mojego wykładu było omówienie aktualnych wytycznych dotyczących leczenia padaczki i padaczki lekoopornej oraz omówienie możliwości wprowadzenia do terapii klinicznych najnowszych cząsteczek będących w trakcie badań klinicznych.

9. **„Progress in diagnostic procedures and treatment in selected neurological diseases”** (2015)

Przedmiotem pierwszej części wykładu, prowadzonego w języku angielskim, było omówienie aktualnych wytycznych dotyczących postępowania w ostrej fazie udaru mózgu z wyraźnym podkreśleniem konieczności umiejętnego rozpoznawania pierwszych objawów choroby oraz podejmowania decyzji w pierwszych godzinach po rozpoznaniu. W drugiej części wykładu poruszyłam problem różnicowania ostrej fazy udaru mózgu z objawami ogniskowymi po napadach padaczkowych, a także zasady udzielania pierwszej pomocy i kontynuowania leczenia przeciwpadaczkowego według aktualnych wytycznych obowiązujących w Polsce.

Prowadzę również wykłady, szkolenia i warsztaty dla lekarzy w zakresie epileptologii w ramach spotkań tematycznych i konferencji szkoleniowych, odbywających się w różnych ośrodkach w całej Polsce. Tematem i celem wykładów szkoleniowych, jest przede wszystkim popularyzacja wiedzy w zakresie diagnostyki i leczenia padaczki oraz chorób współistniejących, korelacji kliniczno-encefalograficznych incydentów napadowych, oceny potencjalnych działań niepożądanych stosowanych leków, zwłaszcza w przypadku koniecznej politerapii.