

Rada Doskonałości Naukowej 00-901 Warszawa, pl. Defilad 1 Dział Kancelaryjny WPŁYNĘŁO (RP/W)	
22.03.2021	
Znak sprawy:	23.1.000.50.2021
Podpis	Zat.

Wydział Lekarski, Collegium Medicum
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
al. Warszawska 30, 11-082 Olsztyn
(nazwa i dane adresowe podmiotu habilitującego,
wybranego do przeprowadzenia postępowania)
za pośrednictwem:
Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Judyta Juranek

(imię i nazwisko wnioskodawcy)

Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka, Wydział Lekarski, UWM, Olsztyn

(miejsce pracy/jednostka naukowa)

Wniosek

z dnia 09.03.2021

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie
nauki medyczne

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia
doktora habilitowanego

Rola Receptora Końcowych Produktów Zaawansowanej Glikacji (RAGE – Receptor for Advanced Glycation
End-products) w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych

Wnioskuje – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie
wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała
uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym**¹

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w
sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej
z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu.
Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c)
Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art.
232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu
przeprowadzenia postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i
obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest
na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-1-0-0-0.html

Judyta Juranek
(podpis wnioskodawcy)

Załączniki: 1. Dane wnioskodawcy 2. Kopia dokumentu potwierdzającego uzyskanie stopnia doktora
3. Autoreferat 4. Wykaz dorobku 5. Analiza bibliometryczna

¹ * Niepotrzebne skreślić.

Autoreferat

dr n. wet. Judyta Karolina Juranek

**Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka
Wydział Lekarski, Collegium Medicum
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie**

1. Imię i nazwisko

Judyta Karolina Juranek

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

- 2002 Tytuł: lekarz weterynarii
Dyplom z oceną bardzo dobrą
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
- 2007 Stopień: doktor nauk weterynaryjnych, dziedzina: neuroanatomia
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Dynamika ekspresji białek strefy aktywnej w korze mózdzku szczura w okresie okołourodzeniowym.”
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
- 2014 Certyfikat: Podstawy nauczania (Fundamentals of Teaching)
New York University Medical Center, Nowy Jork, NY, USA
- 2014 Certyfikat: Koordynowanie badań klinicznych (Clinical Research Coordination)
New York University Medical Center, Nowy Jork, NY, USA

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

- 05.2002 - 09.2007 Studia doktoranckie
Katedra Anatomii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn
- 10.2003 - 09.2004 Stypendium Marie Curie, 5 program ramowy
Department of Neurobiology,
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Goettingen, Niemcy
- 07.2005 - 12.2005 Staż naukowy
Centrum Neuroanatomii, Wydział Lekarski
Charite Universitatmedizin, Berlin, Niemcy
- 01.2006 - 04.2006 Stypendium Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej (EMBO)
Wallenberg Neuroscience Center, Lund University Biomedical Center,
Lund University, Lund, Szwecja
- 08.2007 - 12.2007 Staż naukowy
Wallenberg Neuroscience Center, Lund University Biomedical Center,
Lund University, Lund, Szwecja
- 01.2008 - 06.2010 Staż podoktorski (postdoctoral science fellowship)
Department of Surgery, School of Physicians and Surgeons,
Columbia University Medical Center, Nowy Jork, NY, USA
- 07.2010 - 05.2013 Staż podoktorski (postdoctoral research fellowship)
Diabetes Research Center, Department of Medicine,
New York University Medical Center, Nowy Jork, NY, USA

- 06.2013 - 12.2016 Instruktor naukowy (research instructor)
Diabetes Research Center, Department of Medicine,
New York University Langone Medical Center, Nowy Jork, NY, USA
- 08.2014 - 12.2015 Wykładowca akademicki (adjunct assistant professor)
Department of Science, Borough of Manhattan Community College,
City University of New York, Nowy Jork, NY, USA
- 08.2014 - 05.2019 Wykładowca akademicki (adjunct assistant professor)
Department of Biology, New York College of Technology,
City University of New York, Nowy Jork, NY, USA
- 11.2016 - 09.2017 Wykładowca/Naukowiec wizytujący
Katedra Patofizjologii, Wydział Lekarski, Collegium Medicum,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn
- 01.2017 - 06.2019 Samodzielne stanowisko naukowe (associate research scientist)
Diabetes Research Center, Department of Medicine
New York University Medical Center, Nowy Jork, NY, USA
- 02.2018 - 04.2019 Naukowiec wizytujący
Katedra Patofizjologii, Wydział Lekarski, Collegium Medicum,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn
- 07.2019 - obecnie Kierownik Naukowy Projektu, grant SONATA BIS (2018/30/E/NZ5/00458)
Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka, Wydział Lekarski,
Collegium Medicum Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 219 ust. 1 paragraf 2 Ustawy o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z Dnia 20 lipca 2018 roku

4.1 Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

Rola Receptora Końcowych Produktów Zaawansowanej Glikacji (RAGE – Receptor for Advanced Glycation End-products) w patogenezie chorób neurozwyrodnieniowych

Prezentowane osiągnięcie naukowe jest podsumowaniem wyników moich wieloletnich badań nad rolą RAGE, receptorem końcowych produktów zaawansowanej glikacji w patogenezie chorób neurozwyrodnieniowych człowieka, prowadzonych w laboratoriach biomedycznych kierowanych przez Prof. Ann Marie Schmidt na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Columbia (Columbia University) oraz Uniwersytetu Nowojorskiego (New York University) w Nowym Jorku, USA.

Osiągnięcie obejmuje osiem artykułów naukowych opublikowanych między 2010 - 2016 w czasopiśmie indeksowanych w Journal Citation Reports (JCR). Dane bibliograficzne i infometryczne zostały zebrane i opracowane w oparciu o bazy Web of Science, Scopus Citation Score, Journal Citation Reports, w powiązaniu z profilem pracowniczym Expertus opracowanym przez Bibliotekę Uniwersytecką Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

We wszystkich publikacjach, z wyjątkiem artykułu nr. 5, byłam główną osobą wykonującą doświadczenia naukowe, główną autorką tekstu oraz rycin oraz główną osobą odpowiedzialną za formatowanie oraz przygotowanie ostatecznego układu tekstu.

Łączna punktacja prezentowanych artykułów wynosi:

237 pkt - według wykazu listy czasopism punktowanych opublikowanego przez MNiSW obowiązującego do końca roku 2018:

Łączny współczynnik oddziaływania, impact factor (IF) prezentowanych artykułów według daty publikacji wynosi: **38.998**

Łączna liczba cytowań według bazy Web of Science: 296, bez autocytaowań - 284

4.2 Lista publikacji (autorzy, tytuł publikacji, rok, czasopismo, IF, punktacja MNiSW)

I.p	Tytuł	IF*	Punktacja do 2018	Punktacja** po 2018
1	JK Juranek , A Aleshin, EM Rattigan, L Johnson, W Qu F Song, R Ananthakrishnan, N Quadri, SD Yan, R Ramasamy, AM Schmidt, MS Geddis (2010) <i>Morphological Changes and Immunohistochemical Expression of RAGE and its Ligands in the Sciatic Nerve of Hyperglycemic Pig (Sus Scrofa)</i> . <i>Biochem Insights</i> . 3:47-59.	--	2	20
2	JK Juranek , MS Geddis, F Song, J. Zhang, J Garcia, R Rosario, SF Yan, TH Brannagan, AM Schmidt (2013) <i>RAGE deficiency improves post-injury sciatic nerve regeneration in type 1 diabetic mice</i> . <i>Diabetes</i> 62(3):931-943.	8.87	45	140
3	JK Juranek , MS Geddis, R. Rosario, AM Schmidt (2013) <i>Impaired Slow Axonal Transport in Diabetic Peripheral Nerve is Independent of RAGE</i> . <i>Eur. J. Neurosci.</i> 38(8):3159-68	3.67	30	100
4	JK Juranek , P Kothary, A Mehra, A Hays, TH Brannagan, AM Schmidt (2013). <i>Increased expression of the Receptor for Advanced Glycation End Products in human peripheral neuropathies</i> . <i>Brain and Behavior</i> 3(6):701-709	--	--	70
5	M Manigrasso, JK Juranek , R Ravichandran, AM Schmidt (2014) <i>Unlocking the Biology of RAGE in Diabetic Microvascular Complications - One Ligand at a Time</i> . <i>Trends Endocrinol Metab</i> 25(1):15-22	9.39	45	200
6	JK Juranek , GK Daffu, J Wojtkiewicz, D Lacomis, J Kofler, AM Schmidt (2015) <i>Receptor for Advanced Glycation End Products and its Inflammatory Ligands are Upregulated in Amyotrophic Lateral Sclerosis</i> . <i>Front Cell Neurosci.</i> 22;9:485	4.6	35	100
7	JK Juranek , GK Daffu, MS Geddis, K Li, R Rosario, BJ Kaplan, L Kelly, AM Schmidt (2016) <i>Soluble RAGE Treatment Delays Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in SOD1 Mice</i> . <i>Front Cell Neurosci.</i> 9;10:117	4.55	35	100
8	R Ray, JK Juranek , V Rai (2016) <i>RAGE axis in neuroinflammation, neurodegeneration and its emerging role in the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis</i> . <i>Neurosci Biobehav Rev.</i> 62:48-55	8.30	45	200
	Suma	41.44	257	930

* IF oraz punkty MNiSW danego czasopisma z okresu ukazania się w nim danej publikacji

** punktacja danego czasopisma po wprowadzeniu nowej ustawy o szkolnictwie wyższym i nauce

4.3. Opis osiągnięcia i wyniki

Rola RAGE w patogenezie chorób neurozwyrodnieniowych

Wprowadzenie

RAGE, receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji (Receptor for Advanced Glycation End-products), należy do nadrodziny immunoglobulin i został odkryty oraz po raz pierwszy opisany przez Ann Marie Schmidt i współpracowników w 1992 roku jako powierzchniowy receptor błonowy dla produktów końcowych zaawansowanej glikacji (AGE, Advanced Glycation End-products) [1, 2].

Badania z ostatnich lat wykazały, iż rola RAGE nie ogranicza się do jedynie do wiązania AGE, ale że jest on złożonym receptorem przekaźnikowym, zaangażowanym w wiele sygnalizacyjnych szlaków zapalnych i neurozwyrodnieniowych. RAGE uznany został za jeden z głównych czynników prowadzący do rozwoju różnorodnych zmian patologicznych i stanów chorobowych, począwszy od przyspieszenia procesu naturalnego starzenia się lub prowadząc do rozwoju cukrzycy, po wiele przewlekłych procesów zapalnych i neurozwyrodnieniowych, takich jak arterioskleroza, reumatoidalne zapalenie stawów, obturacyjna choroba płuc, choroba Alzheimera, stwardnienie zanikowe boczne, neuropatie cukrzycowe, rodzinna polineuropatia amyloidowa i innych [3, 4]. Pomimo iż, szczegółowe mechanizmy działania RAGE pozostają niejasne, badania wykazują, iż niekorzystny efekt działania RAGE wywołany jest na skutek powstałych połączeń między RAGE a jego prozapalnymi i/lub regulatorowymi substancjami zwanymi dalej ligandami. Ligandy te zaangażowane są w procesy zapalne oraz wzmożony komórkowy stres oksydacyjny i, poprzez wiązanie z RAGE, wywołają kaskadę szlaków sygnalizacyjnych, destabilizujących komórki i prowadzących do zaburzenia ich funkcjonowania, a w ostateczności do apoptozy komórkowej [4-6]

Struktura RAGE

RAGE kodowany jest przez charakteryzujący się dużą zmiennością gen *AGER* (Advanced Glycosylation End-Product Specific Receptor), umiejscowiony w obrębie regionu układu zgodności tkankowej (MHC) klasy III na chromosomie 6 [7]. Do tej pory opisano ponad 30 polimorfizmów *AGER*, z których większość sklasyfikowano jako polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP, single nucleotide polymorphism), spośród nich dziesięć ma znacznie kliniczne, funkcje pozostałych pozostają do tej pory nieopisane [8, 9].

Jako białko RAGE występuje w dwóch głównych postaciach –

1. Pełnej długości (full length) związanej z błoną komórkową (mRAGE, membrane bound RAGE) oraz
2. sekrecyjnej, wydzielniczej zwaną też postacią rozpuszczalną (sRAGE, secretory/soluble RAGE).

Pełnej długości RAGE składa się z trzech oddzielnych domen:

- a) długiej domeny zewnątrzkomórkowej złożonej z trzech wiążących ligandy regionów V, C1 and C2;
- b) pojedynczej domeny transbłonowej, zakotwiczącej receptor w błonie komórkowej
- c) krótkiej domeny wewnątrzkomórkowej wiążącej ligandy i odpowiedzialnej za inicjowanie szlaków sygnalizacyjnych [4, 10]

Oprócz klasycznego podziału na postać związaną i rozpuszczalną, RAGE opisuje się również na podstawie jego odmian (izoforn) powstałych po splicingu mRNA (splice variants).

Dotychczas opisano 15 różnych wariantów splicingu mRNA RAGE, z tego kilka o znaczeniu fizjologicznym takich jak:

- pełnej długości RAGE,
- DN-RAGE (dominujący negatywny RAGE) pozbawiony domeny cytozolowej
- C-RAGE (C-truncated RAGE) zwany endogennym wydzielniczym RAGE (ang. endogenous secretory RAGE – esRAGE), znany jako 1. Wariant splicingu RAGE – RAGE_v1 – pozbawiony zarówno domeny transbłonowej, jak i cytozolowej [11]
- N-RAGE (N-truncated RAGE) zwany także 2. wariantem splicingu RAGE, RAGE_v2 pozbawionym domeny V



Rycina 1: struktura RAGE: domena zewnątrzkomórkowa, region zmienny (V – variable), region stały (C – constant); domena przetransbłonowa (T-transmembrane); domena wewnątrzkomórkowa (I – intracellular)

Ponadto metodami inżynierii genetycznej stworzono rozpuszczalny RAGE, (sRAGE, soluble RAGE), strukturalnie

zbliżony do wydzielniczego RAGE (esRAGE, endogenous RAGE) [9]. Obydwa warianty, zarówno powstały naturalnie esRAGE, jak i stworzony metodami inżynierii genetycznej sRAGE, mają zdolność hamowania sygnalizacji RAGE, działając jako substytuty RAGE i wiążąc się z jego ligandami [10]

Poziom ekspresji RAGE różni się w zależności od etapu rozwoju, pre- czy postnatalnego. Wysoki poziom ekspresji RAGE, sprzyjający różnicowaniu neuronów z nieodróżnionych embrionalnych komórek macierzystych obserwuje się zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* podczas rozwoju embrionalnego [12, 13], jednak z upływem czasu poziom ekspresji RAGE obniża się, pozostając w okresie dojrzałym na wysokim fizjologicznym poziomie jedynie w tkance płucnej [11]. Oprócz płuc, fizjologicznie ekspresję RAGE obserwuje się w tkankach gruczołów dokrewnych, nerek i mózgu. Na poziomie komórkowym obecność RAGE zaobserwowano w komórkach układu odpornościowego, tj. makrofagach, monocytach, neutrofilach, limfocytach i komórkach dendrytycznych; podocytach, kardiomiocytach, komórkach śródbłonna naczyń i mięśni gładkich naczyń oraz komórkach glejowych i neuronach ośrodkowego układu nerwowego [1, 14].

Wzorce sygnalizacyjne RAGE

RAGE należy do grupy tzw. receptorów rozpoznawania wzorców (PRR, pattern recognition receptors), będących częścią wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i oddziałujących z wieloma ligandami zaangażowanymi w przebieg szlaków sygnalizacyjnych związanych z rozpoznawaniem patogenów lub wyzwalań w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek [15, 16].

W ostatnich latach poczyniono znaczne postępy w określeniu interakcji między RAGE a innymi substancjami zaangażowanymi w ścieżki sygnalizacyjne związane z wrodzoną odpowiedzią immunologiczną, procesy zapalne i stres oksydacyjny, identyfikując szereg nowych, wcześniej nieznanych cząsteczek wiążących oraz szlaków sygnalizacyjnych. Poza pierwszymi opisanymi ligandami, AGE, zaawansowanymi produktami końcowymi glikacji, RAGE poprzez swoją domenę zewnątrzkomórkową może wchodzić w interakcje z produktami białkowymi zaawansowanego utleniania (AOPP, advanced oxidation protein products), rodziną białek z grupy S100/kalgranulin, amfoteryna (HMGB1, high mobility group box 1), transtretyną, składnikami dopełniacza C3a i C1q, włóknkami amyloidowymi (A-beta, amyloid beta fibrils), antygenem makrofagów 1 (Mac-1, macrophage antygen 1), kwasami nukleinowymi, fosfatydyloseryną,

kwasem lizofosfatydowym (LPA, Lysophosphatidic acid) i białkiem szoku cieplnego 70 (HSP70), a poprzez swoją domenę wewnątrzkomórkową z Diaph1 (Diaphanous 1, dawniej mDia1) białkiem regulatorowym zaangażowanym w zmiany strukturalne aktyny) [4, 17].

Badania wykazały, iż RAGE, wiążąc się ze swoistymi ligandami za pośrednictwem domeny zewnątrzkomórkowej, często ulega zmianom strukturalnym, takim jak fosforylacja przy udziale kinazy białkowej C (PKC, protein kinase C) oraz homo-, hetero- lub oligo-dimeryzacja zwiększając powinowactwo tego receptora do wiązania z różnymi wewnątrzkomórkowymi białkami regulatorowymi czy adaptorowymi takimi jak TIRAP (białko adaptorowe zawierające domenę receptora toll-interleukiny 1) i MyD88 (gen pierwotnej odpowiedzi różnicowania szpiku 88) czy transbłonowymi receptorami takimi jak FPR (receptory peptydów formylowych) i BLT1 (receptor 1 leukotrienu B4) [4, 16, 18]. Oddziaływanie RAGE-ligand na poziomie jego domeny zewnątrzkomórkowej wpływają również pośrednio na jego wewnątrzkomórkową domenę cytozolową, modulując interakcje RAGE-Diaph1, pobudzając oksydazę NADPH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) oraz aktywując wtórne przekaźniki, wyzwalaając w ten sposób zróżnicowane szlaki metaboliczne w komórkach takie jak ścieżka sygnalizacyjna Pi3K-AKT lub JAK-STAT (kinaza 3-fosfatydylinozytolu - kinaza białkowa B; phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K/protein kinase B, AKT, signaling pathways lub kinaza janusowa – przetwornik sygnału i aktywator transkrypcji; Janus kinase/signal transducers and activators of transcription, STAT, signaling pathway) [18, 19].

Wpływ oddziaływania RAGE-ligand jest zróżnicowany i zależy od rodzaju komórki, od typu i ilości wiążącego liganda oraz od koncentracji RAGE na powierzchni komórki. Badania wykazują, że w większości przypadków wyniki wiązania RAGE-ligand prowadzą do zaburzenia funkcjonowania komórek czy tkanek, prowadząc do uogólnionych makroskopowych zmian patologicznych i wystąpienia stanów chorobowych. Zdarza się jednak niekiedy, zwłaszcza w okresie przedurodzeniowym, a także w zależności od ilości cząsteczek liganda oraz stopnia zagęszczenia komórkowego RAGE, że wiązanie RAGE-ligand może mieć pozytywne skutki. Badania wykazały, iż w okresie rozwoju prenatalnego w układzie nerwowo-mięśniowym aktywowane przez RAGE ścieżki sygnalizacyjne mają korzystne znaczenie, sprzyjając różnicowaniu neuronów i włókien mięśniowych, wzrostowi neurytów, tworzeniu się miotubul oraz proliferacji komórek nerwowych i mięśniowych. Ponadto zauważono, iż w przypadku uszkodzeń kręgosłupa, przy niewielkiej ilości wiążącego liganda oraz aktywacji neuronalnego RAGE, wywoływane wiązaniem RAGE-ligand ścieżki sygnalizacyjne przynoszą korzystne skutki, działając na komórki Schwanna i promując mielinizację oraz regenerację aksonów, przeciwdziałając w pewnym stopniu negatywnym skutkom zapalenia układu nerwowego spowodowanego nadmierną aktywacją RAGE obecnego na powierzchni mikrogleju oraz astrocytów [20]. Innego przykładu dualistycznego, zależnego od ilości liganda, działania RAGE dostarczają badania nad sygnalizacją RAGE w hodowlach komórkowych nerwiaka zarodkowego poddawanych neurotoksycznemu działaniu amyloidu beta (A-beta), gdzie, w zależności od wyjściowej koncentracji liganda, w tym przypadku S100B, wywoływane wiązaniem RAGE-ligand szlaki sygnalizacyjne miały zupełnie odmienne skutki. Zauważono, iż przy niewielkiej ilości S100B, wiązanie z RAGE zapewniało ochronę przed neurotoksycznością wywołaną przez A-beta na komórki nerwiaka, natomiast duże stężenie tego liganda przy wiązaniu z RAGE, pogłębiało objawy neurotoksyczności wywołane przez A-beta, przyspieszając natomiast śmierć komórek [21, 22]. Podobnie, niski poziom ekspresji RAGE wydaje się sprzyjać migracji, dojrzewaniu i proliferacji przynajmniej w niektórych komórkach układu odpornościowego, takich jak: limfocyty T, komórki dendrytyczne lub granulocyty [23], podczas gdy wysoka ekspresja RAGE prowadzi do zaostrenia odpowiedzi immunologicznej napędzanej nadmierną reaktywnością monocytów i makrofagów/mikrogleju [24].

Rola RAGE w układzie nerwowym – receptor o dwu obliczach

Pozytywna rola szlaków sygnalizacyjnych związanych z RAGE w układzie nerwowym

Obecność RAGE w układzie nerwowym została po raz pierwszy opisana przez Bretta i współpracowników [1] badających rozmieszczenie nowego w tamtym czasie receptora końcowych produktów zaawansowanej glikacji w różnych, pochodzących od dorosłych osobników, tkankach bydłeczych. Badania te wykazały, iż RAGE obecny jest w populacji neuronów kory mózgowej, komórkach wyściółki i mikronaczyniach kory mózgowej, neuronach ruchowych rdzenia kręgowego, a także w wyrostkach neurytów i ciałach komórkowych komórek neuroendokrynych PC12 stymulowanych NGF (czynnik wzrostu nerwów, nerve growth factor) [1]. Prowadzone w dalszych latach badania nad rolą RAGE w układzie nerwowym wykazały, że RAGE, poprzez interakcję ze swoimi ligandami, bierze udział w różnicowaniu neuronów, wzroście i wydłużaniu neurytów oraz regeneracji nerwów po urazach zarówno w zarodkowym, jak i dojrzałym układzie nerwowym, podkreślając jego pozytywną rolę w układzie nerwowym [20, 25-27].

Wiele z efektów działania szlaków sygnalizacyjnych związanych z RAGE w układzie nerwowym zostało odkrytych podczas wczesnych badań dokumentujących interakcje tego receptora z kilkoma szczególnymi ligandami, tj. S100B i HMGB1. S100B należy do rodziny białek S100 wiążących wapń, będących częścią systemu DAMP (Danger/Damage Associated Molecular Patterns, struktury molekularne związane z zagrożeniem/uszkodzeniem), które poprzez wiązanie z receptorami rozpoznającymi wzorce (PRR) takimi jak RAGE, aktywują mechanizm odporności wrodzonej [28, 29]. S100B w fizjologicznych warunkach ulega ekspresji w komórkach gleju, astrocytach w ośrodkowym układzie nerwowym i komórkach Schwanna w obwodowym układzie nerwowym, natomiast w warunkach patologicznych – w przypadku uszkodzeń bądź zapaleń, białko to ulega zwiększonej ekspresji i, jeśli dojdzie do wiązania z PPR, pogłębia zaistniały stan [30].

Z kolei HMGB1 (high mobility group box 1, białko o wysokiej ruchliwości) znane również pod nazwą amfoterina (amphoterin), należy do grupy białek chromosomalnych zaangażowanych w procesy naprawy DNA a także uczestniczące w procesie translacji, replikacji czy rekombinacji DNA [31]. Podobnie jak S100B, białko to jest również częścią systemu DAMP i w sytuacji zagrożenia wydzielane jest przez komórki układu odpornościowego w formie zewnątrzkomórkowej cytokiny, wiążącej się z RAGE oraz innymi PPR, takimi jak receptory toll-podobne (Toll-like receptors), aktywując te receptory oraz wyzwalając zróżnicowane ścieżki sygnalizacyjne [28, 32].

Zaobserwowano, że aktywacja RAGE zarówno przez HMGB1, jak i S100, w nerwiaku zarodkowym i komórkach glejaka sprzyja przeżywalności komórek neuronalnych poprzez indukowany NF- κ B (nuclear factor kappa-B, czynnik jądrowy-kappa B) wzrost ekspresji białka antyapoptotycznego Bcl-2 [13]. Podobne efekty obserwowano także w przypadku wiązania RAGE-S100-HMGB1, gdy oba ligandy w pozornie skoordynowany sposób wiązały się z RAGE, wyzwalając szlaki metaboliczne prowadzące do wzrostu aksonów [13]. Obserwacja ta została później potwierdzona w hodowlach komórek zwojowych korzenia grzbietowego rdzenia kręgowego, gdzie RAGE, przy jednoczesnym wiązaniu się z S100 i HMGB1 aktywował szlaki sygnalizacyjne pobudzające wzrost włókien nerwowych [33]. Rola RAGE w różnicowaniu neuronów została również udokumentowana w neuronalnych komórkach progenitorowych pochodzących od dojrzałych osobników myszy [27]. Podobnie jak w przypadku stymulowanego sygnalizacją RAGE wzrostu aksonów, badania prowadzone nad wpływem roli wiązania RAGE-ligand na wzrost i różnicowanie dojrzałych komórek nerwowych wykazały, iż inkubowane z trzema różnymi ligandami RAGE i w trzech różnych stężeniach hodowle komórkowe wykazywały

zwiększony wzrost w porównaniu do inkubacji z substancją kontrolną, a także wówczas, gdy w hodowli użyto przeciwciała anti-RAGE skutecznie blokującego aktywność neuronalnego RAGE w komórkach, potwierdzając pozytywny wpływ mediacji RAGE-ligand w procesie różnicowania i wzrostu dojrzałych komórek nerwowych [27]. Podobnie, wyniki badań przeprowadzonych na liniach komórkowych nowotworu zarodkowego, dotyczących roli RAGE w różnicowaniu neuronów, wykazały, że wszystkie trzy białka, RAGE, HMGB1 i S100B ulegały dodatniej regulacji przez cały okres różnicowania w nowotworowych liniach komórkowych. Wykazano również, iż oddziaływanie RAGE-ligand było sprzężone z podwyższeniem poziomu chromograniny - składnika strukturalnego pęcherzyków wydzielniczych zaangażowanych w neurosekrecję w synapsach chemicznych [25]. Podobnie, korzystny wpływ działania sygnalizacji wywołanej wiązaniem RAGE-HMGB1 zaobserwowano w hodowlach neuronalnych komórek macierzystych, gdzie przy niskich stężeniach HMGB1 zaobserwowano wzrost kolonii i migrację komórek poprzez wydłużanie filopodiów [34].

Badania wykazały również, że pozytywna sygnalizacja RAGE w układzie nerwowym występuje nie tylko poprzez wiązanie z S100B lub HMGB1, ale także, co zaskakujące, poprzez interakcje z monomerycznym amyloidem beta 1-42 (A β 1-42). W hodowlach komórek nerwiaka zarodkowego, suplementowanych tretynoiną (kwasem retinowym, ATRA, all-trans retinoic acid), wiązanie RAGE-A β 1-42 prowadzi do dodatniej regulacji transbłonowych białek AMIGO (Amphoterin-induced protein), zaangażowanych w elongację i fascykulację aksonów, umożliwiając różnicowanie się i wzrost neuronów [35].

Pozytywną rolę RAGE w układzie nerwowym obserwowano także w warunkach niefizjologicznych przy urazach, co wykazano w badaniach nad rolą RAGE w modelach uszkodzenia rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych [20]. Wykazano, że w modelu urazu rdzenia kręgowego modulująca, stymulująca proces regeneracji nerwowej sygnalizacja RAGE-HMGB1 przeważa nad negatywną, prozapalną, sprzyjając tym samym różnicowaniu neuronalnych komórek macierzystych i przyspieszając regenerację rdzenia kręgowego [36]; podczas gdy w przypadku uszkodzenia nerwu obwodowego interakcja RAGE-S100 uruchamia szlaki pośredniczące w migracji komórek Schwanna, co sprzyja regeneracji nerwów obwodowych po urazie [37].

Negatywne skutki sygnalizacji RAGE w układzie nerwowym

Pomijając wspomniane powyżej badania, liczba doniesień o korzystnych efektach działania sygnalizacji RAGE jest ograniczona, wiele natomiast wiadomo o negatywnym wpływie tej sygnalizacji zarówno w układzie nerwowym jak i poza nim. Przyjmuje się, że negatywny wpływ RAGE wynika z jego roli jako receptora przekąźnikowego, wiążącego się z wieloma prozapalnymi i stymulującymi wzrost stresu oksydacyjnego ligandami, które aktywują odpowiadające im szlaki, prowadząc do zaburzenia funkcji i zwyrodnienia komórek, a w konsekwencji ich śmierci. W warunkach niepatologicznych, ekspresja RAGE w dojrzałych komórkach układu nerwowego utrzymuje się na niskim poziomie, jednak wzrasta wraz ze wzrostem stężenia zewnątrzkomórkowych ligandów zaangażowanych w procesy zapalne i wyzwalające stres oksydacyjny, takich jak AGE, S100B, HMGB1 czy A-Beta. Jak wspomniano wcześniej, badania wykazały, iż S100B, HMGB1, i/lub A-beta mogą wywierać pozytywny wpływ w układzie nerwowym poprzez sygnalizację RAGE, ale aby tak się stało, ich stężenie musi być niskie, nieco powyżej wartości progowej. Im wyższe stężenie, tym bardziej szkodliwe skutki ich interakcji z RAGE. Oprócz zwiększonej aktywności po wiązaniu ligandów, szlaki sygnalizacyjne RAGE mogą być dodatkowo wzmocnione przez jego regulację pozytywną w różnych typach komórek układu nerwowego, tj. mikrogleju, osiadłych makrofagach i astrocytach, co dodatkowo przyspiesza kumulację procesów patologicznych w komórkach nerwowych i tkankach [4, 17].

Badania dotyczące roli RAGE w patogenezie chorób ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, wskazują iż w przypadku chorób neurozwyrodnieniowych, RAGE jest raczej czynnikiem wtórnym niż pierwotnym, nie wpływając bezpośrednio na neurony, raczej pośrednio pogłębia istniejące procesy zwyrodnieniowe poprzez wiązanie się ligandami, wyzwalającymi kaskadę zmian metabolicznych prowadzących do stresu oksydacyjnego i nadmiernej odpowiedzi zapalnej. Wywołane zmiany metaboliczne komórki zależą od typu i stężenia liganda oraz rodzaju komórki. Zgodnie z najnowszymi modelami badawczymi sygnalizacji RAGE w układzie nerwowym, komórki odpornościowe układu nerwowego tj. mikroglej ośrodkowego układu nerwowego oraz osiadłe makrofagi obwodowego układu nerwowego jako pierwsze reagują na nadmierne nagromadzenie ligandów prozapalnych i czynników stresu oksydacyjnego. RAGE obecny na powierzchni wymienionych komórek odpornościowych, zostaje aktywowany po związaniu się ze swoimi ligandami i wraz z wyzwoleniem dalszych patologicznych szlaków stymuluje ekspresję neuronalnego i prawdopodobnie astrocytowego RAGE, wchodząc w dodatnią pętlę ekspresji i przyspieszając progresję zmian patologicznych i prowadząc do zaburzenia funkcjonowania i zwyrodnienia neuronów [4, 17].

Badania dotyczące określenia udziału RAGE w patogenezie konkretnej choroby przeprowadza się często, o ile to możliwe, z zastosowaniem jego antagonistów bądź, w przypadku pracy z modelami zwierzęcymi, usuwając gen kodujący RAGE (RAGE knockout).

Jedną z dobrze przebadanych pod względem udziału RAGE chorób ośrodkowego układu nerwowego przebiegającej z głozią oraz naciekami zapalnymi jest stwardnienie rozsiane (Multiple Sclerosis, MS). Najnowsze, opublikowane we wrześniu 2020 roku badania [38] dotyczące hamowania wzmoczonej sygnalizacji RAGE-S100B w przebiegu tego schorzenia na modelu zwierzęcym oraz w organotypowych kulturach tkanki mózgowej wykazały, iż zastosowanie FPS-ZM1, agonisty RAGE, hamuje wywołany przez lizofosfatydylocholinę (LPC – lysophosphatidylcholine) proces demielinizacji oraz postępującą głozię, manifestującą się przrostem mikrogleju i astrocytów, a także zapobiega postępującemu uszkodzeniu włókien nerwowych obserwowanych w przebiegu choroby, tym samym potwierdzając udział RAGE w patogenezie MS [38].

Innym przykładem schorzenia, w którym zaobserwowano zwiększoną ekspresję RAGE oraz jednego z jego ligandów, HMGB1, jest choroba Parkinsona; tutaj również, podobnie jak w przypadku MS, zauważono, iż podaż angiotensyny 1-7 (Ang 1-7) zwiększa aktywację przeciwzapalnego receptora Mas, promując przeciwzapalne komórkowe ścieżki sygnalizacyjne, jednocześnie osłabiając i hamując prozapalną sygnalizację wywołaną przez wiązanie RAGE-HMGB1, tym samym zmniejszając proces zapalny, niedobór dopaminy i zwyrodnienie ruchowych komórek nerwowych występujące w przebiegu choroby [39].

Podobnie, zwiększoną ekspresję RAGE zauważono również w przebiegu choroby Alzheimera; badania kliniczne z zastosowaniem Azeliragonu, małowcząsteczkowego inhibitora RAGE prowadzone przez firmę Pfizer przyniosły umiarkowane rezultaty, jednak ponowna analiza wyników wykazała, iż zastosowanie tej substancji przynosi pewne korzyści poznawcze w badanej grupie osób z umiarkowanym stopniem choroby Alzheimera, prawdopodobnie poprzez blokowanie prozapalnych ścieżek sygnalizacyjnych wywołanych wiązaniem RAGE-AGE oraz hamując transport A-beta do mózgu, w którym pośredniczy RAGE poprzez swoje wiązanie z A-beta <https://www.alzforum.org/therapeutics/azeliragon>. Z kolei badania z zastosowaniem kwasu wanilinowego, naturalnie występującej pochodnej kwasu benzoowego o właściwościach przeciwzapalnych oraz zapobiegających powstaniu stresu oksydacyjnego, w mysim modelu choroby Alzheimera, wykazały, iż kwas ten ma korzystne działanie, hamując ścieżki sygnalizacyjne RAGE i zmniejszając ich negatywne skutki w ośrodkowym układzie nerwowym obserwowanym w chorobie Alzheimera [40].

Oprócz szlaków sygnalizacyjnych związanych z wcześniej wspomnianymi, najbardziej typowymi ligandami RAGE, negatywne skutki wiązania RAGE na powierzchni komórek i/lub tkanek obserwowano również w przypadku jego interakcji z innymi ligandami, takimi jak LPA, AOPP, czynniki dopełniacza, HSP70 lub Mac-1, tradycyjnie uznawanymi za część szlaków sygnałowych stresu oksydacyjnego/stanu zapalnego, jednak rola tych wiązań w patogenezie chorób układu nerwowego wydaje się drugorzędna w stosunku do wpływu wiązania RAGE z wcześniej opisanymi 'typowymi' ligandami takimi jak AGE, S100B, HMGB1 czy A-beta. Wykazano, iż wiązanie HSP70 wzmacnia niekorzystne, prozapalne ścieżki sygnalizacyjne wywołane wiązaniem RAGE-HMGB1 i RAGE-A-beta spowodowanym posocznicą, długotrwałym stanem zapalnym mózgu, prowadzącym do zaburzeń poznawczych oraz problemów z pamięcią [41]. Jednakże, wcześniejsze badania dotyczące roli HSP70 i RAGE wykazały, iż białko HSP70 może mieć działanie ochronne w chorobie Alzheimera, usuwając uszkodzone białka i chroniąc komórki przed stresem zapalnym i oksydacyjnym, tym samym chroniąc komórki nerwowe przed negatywnymi skutkami ścieżek sygnalizacyjnych związanych z RAGE [42, 43]. Z kolei badania dotyczące wiązania RAGE i Mac-1, wykazały, iż wiązanie to pośredniczy w działaniu mitochondrialnego czynnika transkrypcji A (TFAM, mitochondrial transcription factor A) obecnego na powierzchni komórek mikrogleju, wyzwalając nasiloną odpowiedź zapalną oraz potęgując działanie wydzielanych przez te komórki cytokin w mózgu badanych zwierząt oraz w pierwotnych hodowlach komórek mikrogleju uzyskanych od badanych zwierząt, inkubowanych z TFAM [44].

Podsumowanie

Podsumowując, rola RAGE w układzie nerwowym jest wieloznaczna i nie do końca jeszcze poznana. Większość dotychczasowych badań jednoznacznie wskazuje na negatywny wpływ sygnalizacji RAGE na komórki nerwowe zarówno w ośrodkowym jak i obwodowym układzie nerwowym. Istnieją jednak również badania, które wykazują iż sygnalizacja RAGE jest korzystna w procesie rozwoju układu nerwowego w okresie prenatalnym, a także w przypadku różnego rodzaju urazów ośrodkowego układu nerwowego. W przedstawionych poniżej badaniach, stanowiących część mojego osiągnięcia naukowego skupiłam się na określeniu roli RAGE w patogenezie dwóch nie do końca przebadanych, lecz zbliżonych do siebie pod względem ścieżek sygnalizacyjnych RAGE, chorób obwodowego jak i ośrodkowego układu nerwowego tj. neuropatii cukrzycowej i stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis, znanej również pod nazwą choroby neuronu ruchowego, MND, motor neuron disorder) próbując znaleźć odpowiedź czy i jeśli tak, to jaka – korzystna czy niekorzystna jest rola RAGE w badanych przeze mnie schorzeniach.

Cele i zadania

***Neuropatia cukrzycowa* (publikacje 1 - 5)**

1. Określenie ekspresji RAGE i jego ligandów w uszkodzonych i nieuszkodzonych nerwach kulszowych pochodzących od zwierząt z farmakologicznie wywołaną cukrzycą typu I oraz od pacjentów z długotrwałą cukrzycą typu I oraz II
2. Określenie wpływu delecji genu RAGE na neurozwyrodnienie oraz stan zapalny nerwów obwodowych w uszkodzonych i nieuszkodzonych nerwach obwodowych u myszy z farmakologicznie wywołaną cukrzycą typu I.

***Stwardnienie Zanikowe Boczne (ALS)* (publikacje 6-8)**

1. Określenie ekspresji RAGE i jego ligandów w rdzeniu kręgowym pochodzącym od myszy transgenicznym SOD-G93A z genetycznie uwarunkowanym ALS oraz od zmarłych na ALS osób leczonych w Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Columbia

2. Określenie wpływu farmakologicznego blokowania RAGE na stopień zapalenia, neurozwyrodnienia, sprawność ruchową oraz długość życia transgenicznych myszy SOD-G93A z genetycznie uwarunkowanym ALS

Przegląd badań dotyczących roli RAGE w patogenezie neuropatii cukrzycowej

Cukrzyca jest ogólnoustrojowym zaburzeniem metabolicznym, dotykającym wiele narządów i układów oraz powodując patologiczne zmiany makroskopowe na poziomie narządów lub tkanek; dodatkowo, cukrzyca powoduje również zmiany na poziomie mikroskopowym, komórkowym, wpływając na funkcje pojedynczych komórek wchodzących w skład tkanek i narządów szczególnie wrażliwych na hiperglikemię takich jak małe naczynia krwionośne, naczynia włosowate czy nerwy obwodowe [45, 46]. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat cukrzyca stała się jednym z najczęściej rozpoznawanych schorzeń niezakaźnych i jednym z najpoważniejszych problemów zdrowotnych we współczesnym świecie. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia w 2016 roku liczba osób chorujących na cukrzycę wynosiła 422 miliony (<http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>). Przewiduje się, że u 30% do 70% osób z tej grupy rozwiną się w przebiegu choroby związane z cukrzycą powikłania neurologiczne, takie jak obwodowa neuropatia cukrzycowa (DPN – diabetic peripheral neuropathy) [47, 48].

Do najczęstszych objawów DPN należą mrowienie, drętwienie z niedowładem, przeczulicą, allodynią oraz hiporeflexją. Nieleczona DPN jest najczęstszą przyczyną owrzodzeń i amputacji stóp oraz przyczynia się do poważnych zaburzeń czuciowych oraz ruchowych, wpływając negatywnie na jakość życia tysięcy osób chorujących na cukrzycę oraz generując dodatkowe koszty dla systemu opieki zdrowotnej [49, 50]. Zgodnie z raportem z 2011 roku opartym na danych zebranych z wybranych krajów UE, całkowite roczne koszty poniesione na leczenie osób chorujących na cukrzycę i związane z nią powikłania w samej UE wyniosły 90 mld euro i wykazują trend rosnący [51, 52].

Pomimo szeroko zakrojonych badań, mechanizmy molekularne leżące u podstaw patogenezy DPN nie zostały jeszcze w pełni poznane, uniemożliwiając stworzenie skutecznej terapii mającej na celu zatrzymanie postępu tego schorzenia u osób dotkniętych cukrzycą. Coraz więcej danych wskazuje na to, iż na obraz powstających zmian patologicznych nakłada się kilka czynników takich jak nasilony stan zapalny, podwyższony stres oksydacyjny, glikacja białek i zmiany transportu aksonalnego [53-55].

RAGE, jako wieloligandowy receptor przekąźnikowy, występuje w wielu wrażliwych na hiperglikemię tkankach i powiązany jest z wieloma procesami patologicznymi zaobserwowanymi w patogenezie cukrzycy takimi jak: nasilony stan zapalny, stres oksydacyjny, glikacja białek czy wzmożona apoptoza komórkowa [18, 56]. Dotychczasowe badania dotyczące udziału RAGE w patogenezie cukrzycy prowadzone na zwierzętach z farmakologicznie wywołaną cukrzycą wykazały, iż RAGE przyczynia się do nasilenia miejscowego stanu zapalnego oraz wzmożenia stresu oksydacyjnego we wrażliwych na hiperglikemię tkankach [56, 57]. Udział RAGE w zaburzeniach metabolicznych i widocznych zmianach patologicznych zaobserwowanych w cukrzycy i związanych z nią powikłaniach wykazano w wielu badaniach, jednakże badania te obejmowały głównie zmiany w układzie sercowo-naczyniowym (zaburzenia pracy serca oraz związana z cukrzycą miażdżycza tętnic) [18, 58] oraz wydalniczym (cukrzycowa choroba nerek) [59-61], niewiele natomiast uwagi poświęcono związanym z cukrzycą powikłaniom ze strony układu nerwowego (neuropatie obwodowe).

Badania na zwierzętach z farmakologicznie wywołaną cukrzycą, wykazały, iż nasiloną obecność czynników zwiększających stres oksydacyjny bądź nasilających stan zapalny takich jak AGE czy S100B powoduje aktywację RAGE obecnego na powierzchni komórek układu odpornościowego, zwłaszcza makrofażów, wyzwalając nadprodukcję cytokin i aktywując niekorzystnie komórki

ścieżki sygnalizacyjne prowadzące do zaburzenia ich funkcjonowania oraz w ostateczności apoptozy prowadząc do obserwowanych w cukrzycy wielonarządowych powikłań [62, 63].

W badaniach dotyczących zmian miażdżycowych wywołanych cukrzycą w tętnicach, wykazano znaczny wzrost powierzchni blaszki miażdżycowej, zwiększoną ekspresję RAGE oraz aktywację prozapalnych ścieżek sygnalizacyjnych związanych z RAGE, które ulegały zahamowaniu bądź osłabieniu u zwierząt z farmakologicznie wywołaną cukrzycą, u których usunięto gen kodujący RAGE (RAGE knockout) bądź zastosowano blokery, takie jak rozpuszczalny RAGE (soluble RAGE, sRAGE) czy syntetyczny, małowczątkowy FPS-ZM1 dezaktywujące RAGE bądź też inne podobne substancje wpływające hamująco na sygnalizację RAGE-ligand [64-67]. Ponadto badania wykazały, że antagonizm RAGE-sRAGE tłumil wyzwalaną przez RAGE odpowiedź zapalną poprzez obniżenie poziomów cytokin, poprawiając w ten sposób rokowanie w przebiegu choroby.

In vivo, wykazano iż codzienne podawanie sRAGE wpływa korzystnie na proces gojenia się ran [68, 69], chroni wątrobę przed dalszym uszkodzeniem po przeszczepie [70], hamuje utratę kości przyzębia w zapaleniu przyzębia powstałego jako powikłanie cukrzycy w zwierzęcym modelu tej choroby [71]. Podobnie, wyniki badań dotyczące cukrzycowej choroby nerek z zastosowaniem FPS-ZM1 u myszy z farmakologicznie wywołaną cukrzycą wykazały, iż użycie tej substancji wpływa na poprawę funkcji nerek oraz zmniejsza odczyn zapalny w kłębuszkach nerkowych [72]. Pozytywne zmiany zaobserwowano także przy zastosowaniu FPS-ZM1 w wywołanej cukrzycą osteoporozie, hamując blokową przez ścieżkę sygnalizacyjną RAGE-AGE aktywność ostrogenicznych tłuszczowych komórek macierzystych (adipose-derived stem cells, ASC) [73]. Z kolei badania dotyczące zmian miażdżycowych układu sercowo-naczyniowego spowodowanych cukrzycą przeprowadzone na myszach z delecją RAGE, wykazały iż, usunięcie genu kodującego RAGE jest korzystne, zmniejszając odpowiedź immunologiczną, zwiększając angiogenezę oraz przywracając krążenie w naczyniach dotkniętych miażdżycą [74]. Ciekawym przykładem roli RAGE w cukrzycy są również badania dotyczące cukrzycy ciężowej przeprowadzone na modelu zwierzęcym; wykazano, iż usunięcie genu RAGE wpływa korzystnie na stan ciężarnej samicy oraz rozwijającego się płodu, zmniejszając ryzyko wystąpienia wad płodowych (dysmorfogeneza), a tym samym również obniżając ryzyko wystąpienia embriopatii cukrzycowej [75]. Z kolei badania dotyczące roli RAGE w retinopatii cukrzycowej, wykazały, iż delecja genu kodującego RAGE zapobiega blokowaniu drobnych naczyń krwionośnych w siatkówce, zwiększeniu przepuszczalności naczyń, naciekom zapalnym oraz powstawaniu bezkomórkowych odcinków siatkówki [76].

Przytoczone powyżej badania wskazują na rolę RAGE w patogenezie cukrzycy oraz towarzyszących jej powikłań. Jak wspomniano wcześniej wiele z przytoczonych badań dotyczy zaburzeń w układzie sercowo-naczyniowym oraz wydalniczym, mniej uwagi poświęcono zmianom pojawiającym się w nerwach obwodowych. Do czasu opublikowania przeze mnie prac stanowiących część prezentowanego tutaj osiągnięcia, ilość publikacji na temat roli RAGE w obwodowej neuropatii cukrzycowej była znikoma. Przedstawione poniżej wyniki badań dotyczące roli RAGE w neuropatii cukrzycowej wypełniły lukę w dotychczasowej wiedzy nad udziałem RAGE w patogenezie tego schorzenia, jednocześnie stanowiąc punkt odniesienia do późniejszych badań zajmujących się przedstawioną tematyką.

Materiały i metody

Materiały:

- Młode wykastrowane samce świń rasy Yorkshire z wywołaną farmakologicznie przy użyciu streptozotocyny cukrzycy typu 1: czas trwania doświadczenia - 6 miesięcy

- 2-miesięczne samce myszy C57B6 i RAGE knockout (KO) z - z wywołaną farmakologicznie przy użyciu streptozotocyny cukrzycy typu 1: czas trwania doświadczenia - 2 miesiące
- Fragmenty biopsji nerwów obwodowych pochodzące od pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2 leczonych w Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Columbia, NYC (czas trwania choroby od 5 do 10 lat od rozpoznania)

Wszystkie przeprowadzone na zwierzętach zabiegi zostały zatwierdzone przez Lokalne Komisje Etyczne (IACUC - Institutional Animal Care and Use Committee) Uniwersytetu Columbia oraz Uniwersytetu Nowojorskiego oraz zostały przeprowadzone zgodnie z wytycznymi Narodowego Instytutu Zdrowia Dot. Opieki nad Zwierzętami (National Institute of Health Animal Care Guidelines).

Specyficzne procedury i zabiegi chirurgiczne przygotowane na potrzeby badania

Indukcja (wywołanie) cukrzycy (świnie, myszy)

Cukrzyca została indukowana poprzez dootrzewnowe zastrzyki streptozotocyny (STZ), antybiotyku o działaniu cytostatycznym, toksycznym dla komórek beta trzustki, w dawce 50 mg/kg rozpuszczone w buforze cytrynianowym podawanym przez pięć kolejnych dni. Masę ciała i ogólny stan zdrowia monitorowano dwa razy w tygodniu; poziom glukozy we krwi monitorowano według następującego schematu: pierwszy pomiar, w celu potwierdzenia hiperglikemii, został wykonany 5 dni od ostatniego nastrzyknięcia STZ, następnie powtórna kontrola po dwóch tygodniach, a potem kolejno co 3 tygodnie aż do czasu zakończenia doświadczenia. Do doświadczenia wykorzystano tylko zwierzęta, u których przy pierwszym pomiarze poziom glukozy we krwi wynosił 260 dl/ml (13 mmol/l) i wyżej.

Uszkodzenie (zmiażdżenie) nerwu obwodowego in vivo (myszy)

Dwa miesiące po wywołaniu cukrzycy zwierzęta poddano jednostronnemu zmiażdżeniu nerwu kulszowego za pomocą igłotrzymacza, według wcześniej opisanej procedury [77]. W skrócie, ułożoną na podgrzewanej podkładce mysz, znieczulałam dootrzewnowym zastrzykiem mieszaniny ketaminy i ksylazyny (100 mg/kg ketaminy i 10 mg/kg ksylazyny w buforowanym roztworze soli fizjologicznej, PBS – phosphate buffered saline), znieczulonej myszy odsłaniałam lewy nerw kulszowy od strony wcięcia kulszowego aż do rozwidlenia nerwu. Cztery milimetry powyżej miejsca rozdzielnia miażdżyłam dwukrotnie nerw za pomocą igłotrzymacza Miltex 8-7 zamkniętego na całej zapadce (szerokość 1,5 mm) po 30 sekund z obróceniem o 90 ° pomiędzy uchwyty.

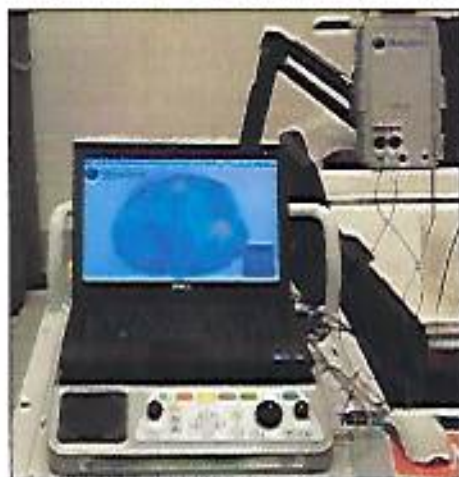
Przeszczep szpiku kostnego (myszy)

Sześciotygodniowe myszy C57BL6 zostały poddane dwukrotnemu napromieniowaniu w odstępach 3-4 godzinnych dawką 600 radów ze źródła Cs137 (JL Shepherd Mark I Irradiator). Po około 3 godzinach od drugiego napromieniowania myszy zostały znieczulone izofluoranem i podano im dooczdolowo zawiesinę szpiku kostnego. Cała procedura została wykonana przez doświadczanego radiologa, moją rolą było dopilnowanie zgodności z procedurą i monitorowanie stanu zwierząt. Roztwór do zawiesin został przygotowany według opracowanej w laboratorium procedury na podstawie dostępnych przepisów [78, 79]. W skrócie, zawiesinę przygotowałam poprzez przepłukanie kości udowej i piszczelowej pobranych od myszy kontrolnych oraz RAGE KO schłodzonym roztworem HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), uzyskany płyn został poddany wirowaniu 1000g, 10min, 4C, po zwirowaniu pozostały płyn usunięto, a otrzymany osad ponownie przepłukałam roztworem HBSS do uzyskania końcowego stężenia 5×10^6 komórek/ml. Po podaniu zawiesiny myszy pozostawały przez 4 tygodnie pod stałą kontrolą pod kątem stanu zdrowia/przyjęcia przeszczepu; po upływie tego okresu myszy rozdzieliłam na 2 grupy: grupę

cukrzycową lub kontrolną, a 2 miesiące później poddałam je jednostronnemu miażdżeniu nerwu kulszowego jak opisano wyżej.

Badanie przewodnictwa nerwowego (nerve conduction velocity)

Do stymulacji i rejestracji sygnału podczas wszystkich badań zastosowałam skomputeryzowany system EMG Nicolet Viking II (Nicolet Biomedical, Madison, WI). Impuls bodźca o fali prostokątnej (0,1 ms) przy bardzo niskim natężeniu (0-20 miliamperów, średnio 4-5 miliamperów) podawano za pomocą dwupolarniej sondy stymulatora Nicolet Viking (numer modelu S403), poprzez dołączone podskórne elektrody igłowe (jednorazowe igły SS-Subdermal Needles firmy Nicolet Biomedical). W badaniach ruchowych nerw kulszowy i jego gałęzie stymulowałam w dwóch miejscach, z zapisem z tego samego dystalnego miejsca dla obu stymulacji. W celu stymulacji proksymalnej elektrodę aktywną umieszczałam w górnej grzbietowo-przyśrodkowej części uda w pobliżu linii środkowej przy wycięciu kulszowym, z elektrodą odniesienia położoną 1 do 3 mm dystalnie. W przypadku stymulacji dystalnej elektrodę czynną umieszczałam w pobliżu przyśrodkowego kolana, z odniesieniem bocznym. Wywołane złożone potencjały czynnościowe mięśni (CMAP, compound motor action potentials) rejestrowałam z mięśnia brzuchatego łydki za pomocą igłowych elektrod rejestrujących (Medtronic, Inc., Tolochenaz, Szwajcaria) z elektrodą odniesienia w ścięgnie kostki. Amplitudy mierzyłam w mikrowoltach, a opóźnienie między stymulacją a początkiem CMAP określałam w milisekundach. Szybkość przewodzenia ruchowego obliczałam, dzieląc odległość między elektrodami (mierzoną za pomocą cienkiej suwmiarki) przez różnicę latencji podczas stymulacji w wycięciu kulszowym w porównaniu z tą uzyskaną podczas stymulacji kolana. W przypadku przewodnictwa nerwu czuciowego nerw łydkowy stymulowałam ortodromicznie za pomocą elektrod igłowych umieszczonych w stopie, z zapisem za pomocą elektrod igłowych w pobliżu nacięcia kulszowego (jak powyżej dla stymulacji motorycznej). Przed odczytem prąd przepuszczałam przez elektrody rejestrujące i obserwowałam reakcję mięśni, w celu sprawdzenia prawidłowego rozmieszczenia elektrod. Rejestrowałam potencjał czynnościowy nerwu czuciowego (SNAP, sensory nerve action potential) oraz mierzyłam amplitudę SNAP oraz opóźnienie między stymulacją a początkiem SNAP. Szybkość przewodzenia czuciowego obliczałam dzieląc odległość między elektrodą stymulującą i rejestrującą (ponownie mierzoną cienką suwmiarką) przez uzyskaną latencję.



Rycina 2: System EMG Nicolet Viking II używany do odczytu prędkości przewodnictwa w nerwach obwodowych.

Każdorazowo, przed wykonaniem testu przewodnictwa nerwowego, myszy znieczulałam mieszaniną ketaminy/ksylazyny jak opisano wcześniej. Podczas pomiaru, temperatura ciała utrzymywała się na poziomie 37° C. W celach porównawczych, podczas każdego badania wykonywałam obustronny pomiar przewodnictwa nerwowego, zarówno w nerwie uszkodzonym jak i nieuszkodzonym.

Pierwotne hodowle makrofagów - badania wpływu hiperglikemii na fenotyp makrofagów

Makrofagi do hodowli pierwotnych uzyskałam ze szpiku kostnego pobranego od 6-tygodniowych, zdrowych, myszy C57BL6 oraz myszy z usuniętym genem RAGE (RAGE KO). Pobieranie oraz przygotowanie materiału do hodowli wykonałam na podstawie wcześniej opisanej procedury Weischenfelda i Porse [80]. W skrócie, lewą i prawą kość udową przepłukałam 10-cio krotnie przy użyciu 5ml strzykawki z igłą 25G (0.5x25) wypełnionej pożywką przeznaczoną do hodowli komórek limfocytarnych; po przepłukaniu, policzyłam komórki w uzyskanej zawieszynie i wysiałam w stężeniu 2×10^6 na 1ml w pożywkę przeznaczoną do hodowli komórkowych makrofagów. Po 7-dniowym okresie inkubacji, uzyskane kultury komórkowe podzieliłam na dwie

grupy i inkubowałam przez 48h w pożywce o niskim, 5mM lub wysokim, 25mM stężeniu glukozy w celu zaobserwowania wpływu różnych stężeń glukozy na fenotyp makrofagów.

Standardowe techniki / procedury użyte w przedstawionych badaniach

- Barwienie błękitem toluidyny – analiza morfometryczna włókien nerwowych
- Barwienie czerwienią oleistą O – ocena stopnia regeneracji aksonów
- Barwienie immunofluorescencyjne (IF) – ocena ilościowa liczby markerów odpowiedzi immunologicznej, rozmieszczenia i kolokalizacja RAGE oraz jego ligandów – CML (karboksymetylolizyna, klasyczny produkt zaawansowanej glikacji, należący do grupy AGE, S100B, HMGB1, Diaph1
- Immunoblotting (WB, western blotting), test immunoenzymatyczny (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) i wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC - high-performance liquid chromatography) - ocena apoptozy, stresu oksydacyjnego, poziomu AGE
- Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction) – analiza jakościowa fenotypu naciekających uszkodzony nerw makrofagów

- wszystkie wymienione powyżej techniki wykonałam przy użyciu standardowych protokołów laboratoryjnych i / lub zgodnie z wytycznymi producenta; dokładne opisy powyższych technik zawarte są w wymienionych wcześniej publikacjach stanowiących podstawę osiągnięcia

Analiza statystyczna

We wszystkich przedstawionych badaniach analizę statystyczną wykonałam za pomocą Graphpad InStat (Graphpad, USA). Wszystkie wartości przedstawiono jako średnią \pm błąd standardowy (SEM). Istotność statystyczną różnic ($p < 0,05$) oceniano jednokierunkową metodą ANOVA z Tukey post-hoc, a następnie dwustronnym testem t (dla porównania grupowego).

Podsumowanie i szczegółowy opis wyników

1. RAGE i jego główne ligandy, tj. AGE, S100B i HMGB1, ale nie Diaph1, ulegają zwiększonej ekspresji w nerwach obwodowych zwierząt z farmakologicznie wywołaną cukrzycą jak i uzyskanych od pacjentów u których rozpoznano cukrzycę (publikacje 1-3)

Wzrost ekspresji RAGE został potwierdzony barwieniem immunofluorescencyjnym (IF) i był następujący:

- a) świnie laboratoryjne - 1,36-krotny wzrost
- b) myszy C57 BL6 - wzrost 1,16-krotny
- c) pacjenci - 1,28-krotny wzrost,

we wszystkich przypadkach jako odniesienie wykorzystywałam odpowiadającą im grupę kontrolną. Ponadto, podwyższona obecność RAGE w cukrzycy została również potwierdzona przez immunoblotting w homogenatach nerwów pochodzących od pacjentów z cukrzycą – wykryta obecność RAGE była 1,16 razy wyższa w porównaniu z kontrolą.

Zmiany w ekspresji ligandów RAGE zostały wykazane przez IF i/lub WB/ELISA lub HPLC. Odnotowałam następujące wartości:

- a) osocze i nerwy obwodowe pobrane od świni laboratoryjnej
 - MG (metyloglioksal, prekursor AGE) ~ 22 razy więcej, pomiar metodą HPLC
 - AGE krążące w osoczu ~ 2-krotny wzrost, pomiar ELISA
 - CML (karboksymetylolizyna, przykładowy AGE) - 1,21 wzrost, analiza IF
 - S100B - 1,46-krotny wzrost, analiza IF

- b) nerwy obwodowe pobrane od myszy C57 BL6;
 - CML - 1,83-krotny wzrost, analiza IF
 - HMGB1 - 1,72-krotny wzrost, analiza IF
- c) bioptyaty nerwów obwodowych pobrane od pacjentów
 - CML - 1,18-krotny wzrost, analiza IF i 1,43 wzrost mierzony metodą WB
 - HMGB1 - wzrost 1,12-krotny, analiza IF i wzrost 1,09 mierzony metodą WB
 - DLAPH1 - spadek 0,93-krotny, analiza IF i wzrost 0,62 mierzony metodą WB

we wszystkich przypadkach jako odniesienie wykorzystałam odpowiadającą im grupę kontrolną.

2. Genetyczna delecja RAGE przyspiesza regenerację nerwów po ostrym uszkodzeniu nerwów obwodowych u myszy z cukrzycą, modulując odpowiedź immunologiczną w miejscu urazu poprzez zmianę fenotypu naciekających makrofagów i zmianę ich charakterystyki z prozapalnej na proregeneracyjną (naprawczą) (publikacje 2 i 5)

Aby zbadać wpływ RAGE na regenerację uszkodzonych nerwów w cukrzycy, nerw kulszowy myszy C57BL6 i RAGE KO poddałam zmiżdżeniu według wcześniej podanej procedury.

Zwierzęta podzieliłam na dwie grupy, A i B, w zależności od planowanego doświadczenia:

W grupie A zwierzęta uśmierciłam 7 dni po wykonanym zabiegu, a materiał pobrany do oceny ilościowej liczby infiltrujących makrofagów oraz oceny stopnia regeneracji włókien nerwowych za pomocą barwienia czerwieńią oleistą; w grupie B zwierzęta 21. dnia po zabiegu zostały w pełnym znieczuleniu poddane badaniu elektrofizjologicznemu w celu oceny prędkości przewodzenia nerwowego, po badaniu zwierzęta zostały uśmiercone, a materiał został pobrany na badania morfometryczne, ponowną ocenę stopnia regeneracji włókien przy pomocy barwienia czerwieńią oleistą oraz analizę ilościową ekspresji RAGE oraz jego ligandów.

Punkty czasowe zostały ustalone na podstawie dostępnych danych dotyczących migracji makrofagów w miejsce uszkodzenia, skorelowanego z okresem przebiegu pierwotnego zwyrodnienia aksonalnego (zwyrodnienie Wallera, Wallerian degeneration). Aby potwierdzić zaobserwowane wyniki, przygotowałam dodatkową grupę myszy, którą poddano przeszczepowi szpiku kostnego, by sprawdzić czy uzyskane wyniki utrzymują się również po usunięciu natywnych komórek odpornościowych.

Przedstawione poniżej wyniki zbierane były przez okres 5 lat i przedstawiały się następująco:

a) Naciekanie makrofagów:

- W grupach cukrzycowych, C57BL6 oraz RAGE KO, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost liczby infiltrujących makrofagów wybarwionych markerem F4/80, zarówno po stronie bliższej (proksymalnej) jak i dalszej (dystalnej) od miejsca uszkodzenia, w porównaniu do grup kontrolnych. Odnotowane wartości przedstawiały się następująco: a) strona proksymalna – kontrola: C57BL6 i RAGE KO odpowiednio: $20,36 \pm 2,56$ i $24,0 \pm 3,34$, cukrzyca: C57BL6 i RAGE KO odpowiednio: $8,5 \pm 1,86$ i $9,83 \pm 1,99$ makrofagów na badanych obszar (ROI – region of interest); b) strona dystalna - C57BL6 i RAGE KO odpowiednio: $2,21 \pm 0,39$ i $1,88 \pm 0,13$, cukrzyca - C57BL6 i RAGE KO odpowiednio: $4,50 \pm 0,7$ i $4,8 \pm 0,68$ makrofagów na ROI, chociaż bezwzględna liczba makrofagów po stronie dystalnej była znacznie niższa zarówno w grupie z cukrzycą, jak i w grupie kontrolnej.

- W nerwie, cukrzyca nie wpłynęła na liczbę makrofagów F4/80-dodatnich, wykazałam natomiast, iż w nerwach pochodzących zarówno od zdrowych jak i cukrzycowych myszy RAGE KO występuje istotnie statystycznie większa liczba napływowych makrofagów F4/80-dodatnich w porównaniu z grupami myszy C57BL6.
- W nerwach nieuszkodzonych nie zaobserwowałam istotnych statystycznie różnic w liczbie makrofagów w żadnej z badanych grup

b) Fenotyp infiltrujących makrofagów:

- Ekspresja prototypowych prozapalnych markerów M1 (CD86 i iNOS) była na podobnym poziomie w obu grupach kontrolnych, ale istotnie statystycznie wyższa w grupie cukrzycowej C57BL6 w porównaniu do cukrzycowej RAGE KO; podobnie, ekspresja proregeneracyjnych markerów M2 (ARG1 i CD206) była na porównywalnym poziomie pomiędzy obiema grupami kontrolnymi, ale istotnie statystycznie niższa w grupie cukrzycowej C57BL6 w porównaniu z cukrzycową RAGE KO
- Zbliżone wyniki uzyskałam również w hodowlach pierwotnych komórek makrofagów pozyskanych od kontrolnych myszy C57BL6 i RAGE KO, inkubowanych w pożywce z niskim (fizjologicznym) lub wysokim stężeniem glukozy z dodatkiem lub bez dodatku CML – przedstawiciela produktów zaawansowanej glikacji (AGE). Zauważalną różnicę w fenotypie M1 i M2 zaobserwowałam pomiędzy makrofagami pochodzącymi od myszy C57BL6 oraz RAGE KO; Makrofagi RAGE KO były chronione zarówno przed wysokim stężeniem glukozy, jak i wysokim stężeniem CML, a ekspresja markerów M2 była w nich wyższa w porównaniu z odpowiadającymi im komórkami uzyskanymi od innych grup.
- Zmianę fenotypu na korzyść makrofagów M2 potwierdziłam dodatkowo u myszy, które przeszły przeszczep szpiku kostnego uzyskanego od myszy RAGE KO. Myszy z cukrzycą C57BL6, które otrzymały szpik kostny od myszy RAGE KO, miały więcej makrofagów z ekspresją M2 niż grupa, która otrzymała szpik kostny od myszy C57BL6

c) Elektrofizjologia:

- W celu ustalenia wpływu cukrzycy oraz RAGE na elektrofizjologiczną odpowiedź nerwu na uszkodzenie, oceniałam prędkość przewodnictwa czuciowego i ruchowego. Wyjściowe badania prędkości przewodzenia nerwów ruchowych i czuciowych (NCV, nerve conduction velocity) nie wykazały istotnych różnic. Zaobserwowałam natomiast istotne statystycznie zmniejszenie NCV w uszkodzonych nerwach, najniższą wartość odnotowano w grupie cukrzycowej C57BL6. Uzyskane, uśrednione wartości przedstawiały się następująco: NCV ruchowe: C57BL6 - $26,08 \pm 1,79$, RAGE KO - $25,75 \pm 3,61$, grupa cukrzycowa: C57BL6 - $16,66 \pm 1,88$, RAGE KO - $21,93 \pm 2,23$ m/s; czuciowe: C57BL6 - $25,5 \pm 1,57$, RAGE KO - $20,09 \pm 2,22$, grupa cukrzycowa: C57BL6 - $8,36 \pm 2,18$, RAGE KO - $15,45 \pm 2,17$ m/s

d) Morfometria:

- Liczba zmielinizowanych włókien na mm^2 była niższa w porównaniu z wartością wyjściową. Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę między myszami kontrolnymi a myszami C57BL6 z cukrzycą. Najmniejszą wartość liczby zmielinizowanych włókien odnotowano w przypadku zwierząt C57BL6 z wywołaną cukrzycą. Uzyskane, uśrednione wartości przedstawiały się następująco: grupa kontrolna: C57BL6 - $8893,5 \pm 1202,2$,

RAGE KO - $8738,6 \pm 946,6$, grupa cukrzycowa: C57BL6 - $6465,2 \pm 159,35$, $7500,2 \pm 363,9$ włókien/mm².

- Podobnie, liczba wewnątrz-nerwowych naczyń krwionośnych na mm² była istotnie we wszystkich badanych grupach. Liczba naczyń krwionośnych była najniższa w grupie myszy cukrzycowych C57BL6, wykazując istotne statystycznie różnice w porównaniu do grupy kontrolnej C57BL6 oraz grup RAGE KO - zarówno kontrolnej jak i cukrzycowej. Uzyskane wartości przedstawiały się następująco: grupy kontrolne: C57BL6 - $13,7 \pm 1,65$, RAGE KO - $12,57 \pm 1,3$, grupy z cukrzycą: C57BL6 - $8,2 \pm 0,8$, RAGE KO - $12,64 \pm 0,9$ naczyń/mm².
- Wymiary regenerujących się włókien nerwowych były również zróżnicowane w zależności od grupy; najkrótsze aksony zaobserwowałam w grupie cukrzycowej C57BL6, w pozostałych grupach wartości były zbliżone do siebie i przedstawiały się następująco: grupy kontrolne: C57BL6 - $5,1 \mu \pm 1,75$, RAGE KO - $5,65 \pm 0,36$, grupy cukrzycowe: C57BL6 - $3,78 \pm 0,23$, RAGE KO - $4,61 \pm 0,22 \mu\text{m}$.
- Obszar barwienia czerwienią oleistą O (Oil Red O), wykazujący obecność lipidów i będący jednym z pośrednich wskaźników regeneracji włókien nerwowych, mierzyłam 7. i 21 dnia po uszkodzeniu. W 7. dniu największy obszar zabarwiony zaobserwowałam w grupie cukrzycowej myszy RAGE KO, natomiast w 21. dniu największą powierzchnię barwienia zaobserwowałam w grupie cukrzycowej C57BL6. Odnotowane wartości przedstawiały się następująco; dzień 7: grupy kontrolne: C57BL6 - $7,3\% \pm 0,24\%$, RAGE KO - $9,58\% \pm 0,54\%$, grupy cukrzycowe: C57BL6 - $9,17\% \pm 0,52\%$, RAGE KO - $11,23\% \pm 1,03\%$; dzień 21: grupy kontrolne: C57BL6 - $4,87\% \pm 0,58\%$, RAGE KO - $3,38\% \pm 0,08\%$, grupy cukrzycowe: C57BL6 - $6,10\% \pm 0,52\%$, RAGE KO - $3,63\% \pm 0,22\%$.

f) barwienia immunofluorescencyjne (nerw kulszowy)

- Zarówno u myszy kontrolnych, jak i myszy C57BL6 z cukrzycą, uszkodzenie nerwu doprowadziło do zwiększonej ekspresji RAGE, odpowiednio 1,33-krotnie i 1,71-krotnie w porównaniu z wartością wyjściową, przy czym RAGE wykazał współwystępowanie (kolokalizacja) z markerami charakterystycznymi dla tkanki okołonerwowej (Muc1), naczyń krwionośnych (CD31) oraz komórek Schwanna (S100) w regenerującym się nerwie.
- Podobnie, ekspresja ligandów RAGE - CML i HMGB1 była istotnie statystycznie wyższa w uszkodzonym nerwie w porównaniu z nerwem nieuszkodzonym. W porównaniu z myszami C57BL6 z cukrzycą, myszy RAGE KO z cukrzycą wykazywały istotnie niższą liczbę włókien CML na początku badania. U wszystkich badanych myszy, włókna pozytywne na HMGB1 i CML były znacznie liczniejsze w zniszczonych nerwach niezależnie od stanu zdrowia (cukrzyca/kontrola) oraz genotypu (kontrola/delecja RAGE), wskazując na obecność stanu zapalnego.

3. Upośledzenie transportu aksonalnego w przebiegu cukrzycy jest niezależne od RAGE (publikacja 4)

W celu zbadania wpływu RAGE na transport aksonalny w przebiegu cukrzycy, myszy C57BL6 i RAGE KO poddałam jednostronnemu podwiązaniu (ligacji) nerwu kulszowego, a próbki nerwów pobierałam 1 godzinę, 3 godziny i 8 godzin później. Procedura i odpowiednie punkty czasowe zostały ustalone zgodnie z wcześniej ustalonym protokołem doświadczenia, opisanym tutaj [81, 82]

Badania transportu aksonalnego przeprowadziłam przy użyciu immunofluorescencji.

Główne wyniki badania były następujące:

- a) RAGE jest transportowany dwukierunkowo, antero- i retrogradowo, ze stałą prędkością i bez zauważalnych strat. Liczba włókien RAGE-dodatnich zgromadzonych w proksymalnym i dystalnym miejscu od podwiązania jest podobna w nerwach kontrolnych i cukrzycowych.
- b) Akumulacja CML – jednego z pierwszorzędowych ligandów RAGE była zmniejszona w grupie myszy RAGE KO, zarówno w nerwach kontrolnych, jak i cukrzycowych w porównaniu z grupami C57BL6.
- c) Akumulacja Diaph1 - regulatora aktyny i jedyne do tej pory opisanego cytoplazmatycznego partnera RAGE jest zmniejszona w nerwach obu grup cukrzycowych, zarówno C57BL6 jak i RAGE KO,
- d) Podobnie, akumulacja neurofilamentu - markera transportu aksonalnego i białka cytoszkieletu, jest zmniejszona w nerwach obu grup cukrzycowych C57BL6, jak i RAGE KO w porównaniu z grupami kontrolnymi.

Uzyskane wyniki wykazały, iż najważniejszym czynnikiem wpływającym na zaburzenia transportu aksonalnego jest cukrzyca, niezależnie od genotypu badanych zwierząt. W swoich badaniach wykazałam również, iż RAGE nie wpływa bezpośrednio na upośledzenie transportu aksonalnego, raczej transport ten jest niezależny od obecności lub braku RAGE; obniżenie transportu głównych białek cytoszkieletu sugeruje, iż w przypadku transportu aksonalnego w grę wchodzi, inne, niezależne od RAGE mechanizmy, powodującego jego zaburzenie.

Wnioski

Opisane w skrócie wyniki mojej pracy badawczej nad rolą RAGE w patogenezie neuropatii cukrzycowej wykazały, iż RAGE i związane z nim ścieżki sygnalizacyjne odgrywają znaczącą rolę w patogenezie tego schorzenia. Wykazałam, iż RAGE oraz związane z nim ligandy ulegają zwiększonej ekspresji w nerwach obwodowych zarówno u ludzi chorych na cukrzycę, jak i w modelach zwierzęcych tej choroby. Ponadto, wyniki moich badań, przeprowadzonych na kontrolnych i chorych na cukrzycę myszach C57BL6 (tzw. dziki fenotyp) oraz myszach, u których usunięto gen kodujący RAGE (RAGE knockout) wykazały, iż RAGE przyczynił się do nieprawidłowej adaptacji mechanizmów zapalnych podczas pourazowego pierwotnego zwyrodnienia aksonalnego tzw. zwyrodnienie Wallera wpływając na fenotyp makrofagów obecnych w miejscu urazu, regulując ich przełączanie z fenotypu prozapalnego (M1) na przeciwwzapalny (M2) wpływając na mechanizmy naprawcze i wskaźniki regeneracji aksonów w obwodowej neuropatii cukrzycowej [50]. Z kolei, opierając się na doniesieniach wskazujących, iż upośledzony transport aksonalny obserwowany w neuropatii cukrzycowej może być związany ze zwiększoną glikacją białek [51] wyzwalaną przez szlaki sygnalizacyjne RAGE, wpływającą na główne białka cytoszkieletu, takie jak aktyna, neurofilament i pokrewne cząsteczki oraz przyczyniającą się do rozwoju neuropatii cukrzycowej, w szeregu doświadczeń przeprowadzonych na czterech grupach zwierząt: C57BL6 i RAGE KO kontrolnych oraz z wywołaną cukrzycą, zaobserwowałam, zgodnie z wcześniejszymi przypuszczeniami, nasilony transport RAGE i jego liganda, CML, w podwiązanym nerwie pochodzącym od zwierząt z cukrzycą, w krótkim czasie od zabiegu, jednak, co zaskakujące, ilość włókien zawierających neurofilament oraz Diaph1, liganda zarówno RAGE jak i aktyny, obniżyła się w obydwu grupach cukrzycowych niezależnie od genotypu, wskazując, iż obserwowane w cukrzycy zaburzenia transportu białek związanych z cytoszkieletem, takich jak Diaph1 i neurofilament, nie są bezpośrednio zależne od zwiększonej ekspresji RAGE czy CML, raczej zaburzenie to może być

wywołane związanym z hiperglikemią niedokrwieniem i w konsekwencji osłabieniem włókien nerwowych i zaburzeniem transportu aksonalnego. Obecnie, w moim autorskim projekcie SONATA BIS nr. 2018/30/E/NZ5/00458 dotyczącym roli sygnalizacji Diaph1 w patogenezie neuropatii cukrzycowej rozpoczęłam doświadczenia mające na celu dokładne określenie roli Diaph1 w obserwowanych zaburzeniach transportu.

STWARDNIENIE ZANIKOWE BOCZNE

Przegląd badań dotyczących roli RAGE w patogenezie stwardnienia zanikowego bocznego

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis) to nieuleczalna, postępująca choroba neurozwyrodnieniowa ośrodkowego układu nerwowego. Charakteryzuje się wybiórczą utratą neuronów ruchowych rdzenia kręgowego, pnia i kory mózgu. Rocznie, w Europie odnotowuje się średnio 2 nowe przypadki na 100 000 osób, co stanowi około 15 000 nowych przypadków każdego roku [83, 84]. Zwykle początek ALS następuje w wieku 40-70 lat, choć zdarzają się przypadki rozpoznania tej choroby w wieku 20-30 lat; większość pacjentów umiera w ciągu 5 lat od rozpoznania choroby. Szybko postępujące pogorszenie stanu zdrowia, słabo poznana etiologia oraz brak skutecznej terapii sprawiają, że ALS jest jedną z najbardziej wyniszczających i problematycznych chorób neurozwyrodnieniowych na świecie. Choć patogeneza choroby pozostaje w dużej mierze nieznana, coraz więcej dowodów wskazuje na to, iż postępujące neurozwyrodnienie neuronów ruchowych w ALS wynika z połączenia wielu czynników, takich jak zwiększony stres oksydacyjny, neurozapalenie, nieprawidłowe fałdowanie i agregacja białek, ekscytotoksyczność, dysfunkcja mitochondriów i upośledzenie transportu aksonalnego [85, 86].

Najnowsze badania sugerują, że RAGE jako czynnik prozapalny i promotor stresu oksydacyjnego, może być jednym z kluczowych czynników przyczyniających się do patogenezy i rozwoju tej nieuleczalnej choroby. Powszechnie przyjmuje się, że stres oksydacyjny, stan zapalny i apoptoza są związane z patogenezą i rozwojem ALS [85, 87]. Liczne badania wskazują na interakcję ligand-RAGE w powstawaniu reaktywnych form tlenu (ROS, reactive oxidative species) i nagromadzenia czynników zapalnych [88-90]. Z cytowanych na wstępie badań wiemy, iż w ośrodkowym układzie nerwowym RAGE występuje w neuronach, komórkach mikrogleju i astrocytach, przy czym skutki aktywacji RAGE oraz ścieżki sygnalizacyjne aktywowane na skutek wiązania RAGE-ligand zależą zarówno od typu aktywowanej komórki jak i rodzaju liganda, powodując specyficzne dla danego typu komórki reakcje [91].

Jak wspomniano wcześniej, wpływ aktywacji RAGE na neurony, astrocyty i mikroglej różni się w zależności od konkretnej izoformy, a także poziomu stężenia RAGE na powierzchni komórki [91]. Na przykład na powierzchniach neuronów interakcje RAGE z jego ligandami - AGE i/lub amyloidem β powodują nasilenie stresu oksydacyjnego i aktywację komórkową czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [92, 93], podczas gdy wiązanie S100/kalgranulin z RAGE na komórkach jednojądrzastych i limfocytach aktywuje produkcję kluczowych prozapalnych mediatorów [94]

Obecność RAGE w ALS wykazano dopiero w 2009 roku [95]. Wówczas to po raz pierwszy zademonstrowano obecność rozpuszczalnego RAGE w osoczu pacjentów dotkniętych ALS, ponadto wykazano również, iż stężenie wykrytego RAGE jest niższe w porównaniu do grupy kontrolnej, świadcząc o tym, iż obecność tego receptora może mieć istotne znaczenie w patogenezie tej nieuleczalnej choroby.

Badania wskazujące na rolę nadmiernej odpowiedzi immunologicznej w postępującym zwyrodnieniu neuronów ruchowych obserwowanych w ALS ukazały się w 2011 [96]. Zaobserwowano wówczas w tkankach pobranych od pacjentów zmarłych na ALS zwiększoną ekspresję receptorów związanych z odpowiedzią immunologiczną, RAGE oraz dwóch Receptorów

Toll-podobnych (Toll-like receptors, TLR2, TLR4). Przesłanki, sugerujące iż RAGE może mieć udział w patogenezie ALS opierały się głównie na wynikach wcześniej opisanych przeze mnie badań o roli RAGE w układzie nerwowym, wskazujące na to, iż receptor ten, ze względu na swoje powinowactwo do wielu substancji zaangażowanych w nadmierną odpowiedź immunologiczną oraz nasilających stres oksydacyjny, uważanych za dwa z kluczowych procesów prowadzących do zwyrodnienia neuronów ruchowych w ALS, może mieć znaczenie w patogenezie tego schorzenia. Opierając się na powyższym stwierdzeniu, postawiłam hipotezę, iż w przebiegu ALS sygnalizacja, w której pośredniczy RAGE, nasila stan zapalny oraz stres oksydacyjny, prowadząc do wzmożonej syntezy i uwalniania cząsteczek prozapalnych i reaktywnych form tlenu (ROS), zaostrzając istniejące procesy patologiczne i prowadząc do przyspieszonej śmierci neuronów, z kolei zablokowanie RAGE, uniemożliwiające powstawanie wiązań RAGE-ligand powinno osłabić odczyny zapalne oraz stres oksydacyjny, łagodząc objawy oraz spowalniając przebieg choroby.

Materiały i metody

- Pochodzące z banku tkanek fragmenty rdzenia kręgowego od zmarłych pacjentów chorych na ALS otrzymane w ramach współpracy międzyuczelnianej z Uniwersytetu w Pittsburghu oraz za pośrednictwem fundacji Target ALS ©
- 8-tygodniowe transgeniczne samce myszy SOD1G93A (B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J) z wrodzonym ALS zakupione z Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA); początek choroby wystąpił między 10 a 12 tygodniem życia. Samice transgeniczne SOD1 trzymano jako kontrolę wewnętrzną, a wszystkie samce pogrupowano według wagi i losowo podzielono na dwie grupy (kontrolną i eksperymentalną).
- Data humanitarnego zakończenia (humane end-point) eksperymentu odpowiadała końcowemu stadium choroby i została określona w oparciu o wytyczne Narodowego Instytutu Zdrowia Dot. Opieki nad Zwierzętami oraz zatwierdzona przez Lokalne Komisje Etyczne (IACUC, Institutional Animal Care and Use Committees) Uniwersytetów Columbia oraz Nowojorskiego. Data ta odpowiadała terminowi, w którym zwierzę utraciło 20% masy wyjściowej i/lub nie było zdolne do samodzielnego podniesienia się w ciągu 20 sekund od położenia na boku [97, 98]. Za początek choroby uznano okres, w którym zwierzę straciło około 10% maksymalnej masy ciała, ale przed wystąpieniem zaburzeń motorycznych [98]. Wszystkie doświadczenia zostały zatwierdzone przez Lokalne Komisje Etyczne (IACUC) Uniwersytetu Columbia oraz Nowojorskiego. Począwszy od 8 tygodnia życia, zwierzęta monitorowałam pod względem stanu zdrowia (waga, postawa, chód, apetyt). Ze względu na ochronny wpływ estrogenu na wystąpienie i przebieg ALS u samic, w celu zapewnienia spójności wyników w przedstawionych badaniach wpływu farmakologicznego blokowania RAGE na długość życia i sprawność ruchową użyłam tylko samce [99, 100].

Specyficzne procedury i zabiegi chirurgiczne przygotowane na potrzeby badania

Farmakologiczne blokowanie RAGE:

Farmakologiczne blokowanie RAGE nastąpiło przy użyciu rozpuszczalnego RAGE (sRAGE, soluble RAGE) przygotowanego w laboratorium prof. Ann Marie Schmidt, według opracowanej wcześniej procedury. sRAGE podawany był dootrzewnowo w dawce 175 µg, raz na dobę, począwszy od 8 tygodnia życia aż do zakończenia eksperymentu (humanitarne uśmiercenie). Myszy kontrolne otrzymały dootrzewnowo albuminę surowicy mysiej w takiej samej dawce 175 µg/raz na dobę.

Ocena sprawności ruchowej

Do oceny sprawności ruchowej zastosowałam standardowe, szeroko stosowane i sprawdzone testy sprawnościowe opisane poniżej. Ocenę sprawności rozpoczęłam po okresie 2-tygodniej aklimatyzacji, gdy zwierzęta osiągnęły 8 tygodni. Każdy z opisanych poniżej testów wykonywałam dwa razy w tygodniu, do momentu, gdy zwierzęta nie były już w stanie wykonywać danego zadania w prawidłowy sposób z powodu postępujących zaburzeń ruchowych. Każdy test wykonywałam w trzykrotnym powtórzeniu i dla każdej sesji testowej zapisywałam średnią wartość.

Test siły mięśni: Siłę mięśni mierzyłam za pomocą testu zwisu na odwróconej kratce, jak opisano wcześniej [101]. W skrócie, każde zwierzę umieszczałam na tradycyjnej drucianej pokrywie klatki, umieszczonej ok 50cm nad wyściółką, odwracałam do góry nogami i obserwowałam przez 60 sekund, jak widoczne na filmie <https://tinyurl.com/yyu2ffgl>. Na początku okresu testowego wszystkie myszy były w stanie utrzymać się na odwróconej kratce przez cały okres pomiaru (60 sekund), jednak wraz z postępem choroby okres ten skracał się, do momentu, gdy zwierzę nie było w stanie utrzymać się na kratce powyżej 2 sekund.

Test siła uchwytu: ten test używałam do oceny siły mięśni kończyn. Siła uchwytu tylnej kończyny była mierzona zgodnie z wytycznymi podanymi przez producenta (miernik siły chwytu, Panlab, Barcelona, Hiszpania) poprzez opuszczenie myszy w kierunku metalowej siatki. Podczas badania, na początku pozwala się zwierzęciu chwycić wszystkimi kończynami siatki połączonej z przetwornikiem mierzącym siłę, następnie delikatnie i powoli odciąga zwierzę aż do zwolnienia przez nie uchwytu. Zasadę testu widać na filmie <https://tinyurl.com/y3ochtfu>



Rycina 3: Po lewej próba testu siły mięśni, mysz umieszczona na kratce trzymanej ok 50cm nad podłożem ma za zadanie utrzymać się w tej pozycji przez 60 sekund. Testy wykonywałam w trzech powtórzeniach, z 1-minutową przerwą między każdym powtórzeniem. Po prawej, przygotowanie do testu siły

uchwytu. Mysz chwyciła się mocno kratki przyłączonej do miernika siły; test trwa 2-3 sekundy, pomiar wykonuje się w trzech powtórzeniach, z 15 sekundową przerwą między powtórzeniami. Obywa testy wykonywałam w 60 minutowych odstępach, żeby dać zwierzęciu czas na odpoczynek

Standardowe techniki / procedury użyte w przedstawionych badaniach

- Barwienie Nissla (analiza liczby neuronów)
- Barwienie immunohistochemiczne (ilościowa ocena ekspresji RAGE i powiązanych ligandów, ocena glejozy)
- Immunoblotting (WB) i RT-PCR (jakościowa ocena ekspresji RAGE i powiązanych ligandów)

- wszystkie wymienione powyżej techniki wykonywałam przy użyciu standardowych protokołów laboratoryjnych i / lub zgodnie z wytycznymi producenta; dokładne opisy zawarte w publikacjach 6-8.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadziłam za pomocą Graphpad InStat (Graphpad, USA). Wszystkie wartości przedstawiono jako średnią \pm błąd standardowy (SEM). Istotność statystyczną różnic

($p < 0,05$) oceniano jednokierunkową metodą ANOVA z Tukey post-hoc, a następnie dwustronnym testem t (dla porównania w ramach grupy).

Podsumowanie oraz szczegółowy opis wyników

1. RAGE i jego ligandy ulegają zwiększonej ekspresji w ludzkich i mysich rdzeniach kręgowych w końcowym stadium choroby (publikacje 6-8)

Analiza immunohistochemiczna i WB wykazały, iż ekspresja RAGE i jego ligandów, S100B, CML i HMGB1 była istotnie statystycznie wyższa w próbkach rdzenia kręgowego człowieka i myszy z ALS w porównaniu z grupą kontrolną.

- a) W próbkach rdzeni kręgowych pochodzących od zmarłych pacjentów, ekspresja RAGE była wyższa o około 70%, podobnie w przypadku ekspresji S100B zaobserwowałam około 70% wzrost, natomiast znacznie wyższy, w porównaniu do pozostałych, bo aż trzykrotny wzrost ekspresji zaobserwowałam w przypadku HMGB1 oraz dwukrotny w przypadku CML w barwieniu immunofluorescencyjnym w porównaniu do kontroli (barwienia w grupie kontrolnej stanowiły punkt odniesienia dla próbek z ALS, ustawione jako wartość referencyjna, 100%). Ponadto, współwystępowanie (kolokalizacja) RAGE i jego ligandów, takich jak S100B, CML i HMGB1, była wyższa w próbkach pochodzących od chorych na ALS w porównaniu do próbek kontrolnych. Potrójne barwienia pod kątem RAGE, S100B, CML i HMGB1 ujawniły zwiększoną immunoekspresję tych białek w rdzeniu kręgowym ALS w porównaniu z grupą kontrolną. Uzyskane wyniki potwierdziły się również w WB.
- b) W próbkach rdzeni kręgowych pochodzących od transgenicznym myszy, immunoekspresja RAGE była wyższa w próbkach ALS w porównaniu z grupą kontrolną, co potwierdziło się również w analizie immunohistochemicznej i RT-PCR.

2. Farmakologiczne blokowanie RAGE poprawia sprawność ruchową i przedłuża życie transgenicznym myszy SOD1 z dziedzicznym ALS

- a) Myszy transgeniczne SOD1, którym podawałam sRAGE cechują się dłuższą przeżywalnością, wykazują wolniejsze tempo utraty wagi oraz dłużej utrzymującą się sprawnością ruchową w porównaniu z myszami kontrolnymi, którym podawano placebo.
- b) W rdzeniu kręgowym pochodzącym od myszy, którym podawałam sRAGE, liczba przetrwałych neuronów ruchowych była statystycznie istotnie wyższa niż w tkankach pochodzących od grupy kontrolnej; podobnie, w tkance tej wykryto mniej astrocytów niż w tkance pochodzącej od grupy kontrolnej.

Nagrania pokazują wyraźne różnice w koordynacji motorycznej i ogólnej sprawności ruchowej między grupami. Nagranie 1 <https://tinyurl.com/yysmuq6j> (MSA versus sRAGE - film 1.3): Dwa osobniki z tego samego miotu, wiek 14 tygodni, umieściłam w dwóch oddzielnych klatkach, aby pokazać różnice w chodzie i postawie między nimi. Podczas gdy mysz, której wstrzyknęłam MSA (po lewej stronie) z trudem się porusza, zwierzę, któremu wstrzyknęłam sRAGE (po prawej stronie), porusza się stosunkowo szybko i bez większych trudności.

Wnioski

W swoich badaniach pokazałam po raz pierwszy za pomocą badań ilościowych, a nie tylko jakościowych, iż RAGE ulega podwyższonej immunoekspresji w rdzeniu kręgowym pochodzącym od pacjentów zmarłych na ALS. W przeciwieństwie do wcześniejszych doniesień, moja analiza immunofluorescencyjna, WB oraz RT-PCR ujawniły, iż poziom RAGE jest podwyższony nie tylko na poziomie białkowym, ale również ekspresja jego genu, AGER, jest wyższa w tkance rdzenia kręgowego pacjentów zmarłych na ALS. Ponadto zaobserwowałam, że nie tylko poziom RAGE, ale także jego prozapalnych ligandów jest podwyższony, a ich ekspresja wzrasta w tkance dotkniętej ALS. Przedstawione obserwacje, w połączeniu z informacjami pochodzącymi z badań dotyczących roli RAGE oraz skutków wiązania RAGE-ligand w chorobie Alzheimera, dokładniej zbadanej choroby neurodegeneracyjnej sugerują, że szlaki sygnalizacyjne wyzwalane przez RAGE stanowią integralną część patogenezы ALS, zaostrzając zaistniałe zmiany patologiczne obserwowane w neuronach rdzenia kręgowego osób dotkniętych ALS. Co więcej, wyniki moich badań po raz pierwszy pokazały, iż farmakologiczna blokada RAGE ma korzystny wpływ na przebieg choroby u transgenicznych myszy z wrodzonym ALS, opóźniając wystąpienie pierwszych objawów choroby, pozwalając na dłuższe utrzymanie sprawności fizycznej oraz przedłużając długość życia. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami moich badań dotyczących patogenezы neuropatii cukrzycowej, w których wykazałam, iż usunięcie genu kodującego RAGE wpływa pozytywnie na proces regeneracji uszkodzonych nerwów, przyspieszając ten proces w mysim modelu cukrzycy. Prowadzone obecnie przez nasz zespół, w szczególności doktorantkę, której jestem promotorem pomocniczym, mechanistyczne badania dotyczące udziału RAGE oraz jego ligandów w procesach patologicznych obserwowanych w przebiegu ALS potwierdzają uzyskane przeze mnie wyniki i wskazują na istotną rolę RAGE w patogenezы tej nieuleczalnej choroby.

Końcowe podsumowanie badań nad rolą RAGE w patogenezы chorób neurodegeneracyjnych stanowiących podstawę osiągnięcia

1. RAGE i jego prozapalne ligandy, S100B, HMGB1 i CML ulegają zwiększonej ekspresji zarówno w obwodowym, jak i ośrodkowym układzie nerwowym w stanie chorobowym
2. Delecja genu kodującego RAGE wpływa pozytywnie na proces regeneracji uszkodzonych mechanicznie włókien nerwowych w cukrzycy, modulując fenotyp makrofagów zaangażowanych w proces oczyszczenia miejsca uszkodzenia, przyspieszając procesy odnowy i wzrostu uszkodzonych włókien nerwowych
3. Farmakologiczne blokowanie RAGE powoduje opóźnienie pierwszych objawów ALS u transgenicznych myszy z dziedzicznym ALS, spowalniając jego przebieg poprzez zakłócanie szlaków sygnalizacyjnych RAGE-ligand, chroniąc do pewnego stopnia neurony ruchowe przed przyspieszoną degeneracją

Literatura

1. Brett, J., et al., *Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues*. Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1699-712.
2. Schmidt, A.M., et al., *Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface*. J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14987-97.
3. Series, W.T.R., *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. World Health Organization technical report series, 2003. **916**: p. i-viii, 1-149, backcover.
4. MacLean, M., et al., *The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and DIAPH1: Implications for vascular and neuroinflammatory dysfunction in disorders of the central nervous system*. Neurochem Int, 2019. **126**: p. 154-164.

5. Xie, J., et al., *Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE)*. Cell Signal, 2013. 25(11): p. 2185-97.
6. Wautier, M.P., P.J. Guillausseau, and J.L. Wautier, *Activation of the receptor for advanced glycation end products and consequences on health*. Diabetes Metab Syndr, 2017. 11(4): p. 305-309.
7. Sugaya, K., et al., *Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3*. Genomics, 1994. 23(2): p. 408-19.
8. Serveaux-Dancer, M., et al., *Pathological Implications of Receptor for Advanced Glycation End-Product (AGER) Gene Polymorphism*. Dis Markers, 2019. 2019: p. 2067353.
9. Hudson, B.I., et al., *Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants*. FASEB J, 2008. 22(5): p. 1572-80.
10. Kalea, A.Z., A.M. Schmidt, and B.I. Hudson, *Alternative splicing of RAGE: roles in biology and disease*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. 16: p. 2756-70.
11. Lee, E.J. and J.H. Park, *Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases*. Genomics Inform, 2013. 11(4): p. 224-9.
12. Huttunen, H.J., J. Kuja-Panula, and H. Rauvala, *Receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling induces CREB-dependent chromogranin expression during neuronal differentiation*. J Biol Chem, 2002. 277(41): p. 38635-46.
13. Huttunen, H.J., et al., *Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation*. J Biol Chem, 2000. 275(51): p. 40096-105.
14. Schmidt, A.M., et al., *Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions*. Arterioscler Thromb, 1994. 14(10): p. 1521-8.
15. Chavakis, T., et al., *The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment*. J Exp Med, 2003. 198(10): p. 1507-15.
16. Teissier, T. and E. Boulanger, *The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging*. Biogerontology, 2019. 20(3): p. 279-301.
17. Derk, J., et al., *The Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) and Mediation of Inflammatory Neurodegeneration*. J Alzheimers Dis Parkinsonism, 2018. 8(1).
18. Egana-Gorrone, L., et al., *Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Mechanisms and Therapeutic Opportunities in Diabetes and Cardiovascular Disease: Insights From Human Subjects and Animal Models*. Front Cardiovasc Med, 2020. 7: p. 37.
19. Jangde, N., R. Ray, and V. Rai, *RAGE and its ligands: from pathogenesis to therapeutics*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2020. 55(6): p. 555-575.
20. Song, J., et al., *Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligands: focus on spinal cord injury*. Int J Mol Sci, 2014. 15(8): p. 13172-91.
21. Businaro, R., et al., *S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against Abeta amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases Abeta amyloid neurotoxicity at high doses*. J Neurosci Res, 2006. 83(5): p. 897-906.
22. Huttunen, H.J., C. Fagcs, and H. Rauvala, *Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways*. J Biol Chem, 1999. 274(28): p. 19919-24.
23. Kierdorf, K. and G. Fritz, *RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond*. J Leukoc Biol, 2013. 94(1): p. 55-68.
24. Sorci, G., et al., *RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1833(1): p. 101-9.

25. Kim, J., et al., *The role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in neuronal differentiation*. J Neurosci Res, 2012. **90**(6): p. 1136-47.
26. Wang, L., S. Li, and F.B. Jungalwala, *Receptor for advanced glycation end products (RAGE) mediates neuronal differentiation and neurite outgrowth*. J Neurosci Res, 2008. **86**(6): p. 1254-66.
27. Meneghini, V., et al., *A novel role for the Receptor for Advanced Glycation End-products in neural progenitor cells derived from adult SubVentricular Zone*. Mol Cell Neurosci, 2010. **45**(2): p. 139-50.
28. Roh, J.S. and D.H. Sohn, *Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases*. Immune Netw, 2018. **18**(4): p. e27.
29. Kato, J. and C.I. Svensson, *Role of extracellular damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) as mediators of persistent pain*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015. **131**: p. 251-79.
30. Gonzalez, L.L., K. Garric, and M.D. Turner, *Role of S100 proteins in health and disease*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020. **1867**(6): p. 118677.
31. Ulloa, L. and D. Messmer, *High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(3): p. 189-201.
32. Sharma, S.K. and G. Naidu, *The role of danger-associated molecular patterns (DAMPs) in trauma and infections*. J Thorac Dis, 2016. **8**(7): p. 1406-9.
33. Saleh, A., et al., *Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) activates divergent signaling pathways to augment neurite outgrowth of adult sensory neurons*. Exp Neurol, 2013. **249**: p. 149-59.
34. Xue, X., et al., *High-mobility group box 1 facilitates migration of neural stem cells via receptor for advanced glycation end products signaling pathway*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 4513.
35. Piras, S., et al., *Monomeric Abeta1-42 and RAGE: key players in neuronal differentiation*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(6): p. 1301-8.
36. Wang, H., et al., *HMGB1/Advanced Glycation End Products (RAGE) does not aggravate inflammation but promote endogenous neural stem cells differentiation in spinal cord injury*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10332.
37. Sbai, O., et al., *RAGE-TXNIP axis is required for S100B-promoted Schwann cell migration, fibronectin expression and cytokine secretion*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 24): p. 4332-9.
38. Santos, G., et al., *S100B Impairs Oligodendrogenesis and Myelin Repair Following Demyelination Through RAGE Engagement*. Front Cell Neurosci, 2020. **14**: p. 279.
39. Rabie, M.A., et al., *Correlation between angiotensin 1-7-mediated Mas receptor expression with motor improvement, activated STAT3/SOCS3 cascade, and suppressed HMGB-1/RAGE/NF-kappaB signaling in 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rats*. Biochem Pharmacol, 2020. **171**: p. 113681.
40. Ullah, R., et al., *Vanillic Acid, a Bioactive Phenolic Compound, Counteracts LPS-Induced Neurotoxicity by Regulating c-Jun N-Terminal Kinase in Mouse Brain*. Int J Mol Sci, 2020. **22**(1).
41. Gasparotto, J., et al., *Receptor for advanced glycation end products mediates sepsis-triggered amyloid-beta accumulation, Tau phosphorylation, and cognitive impairment*. J Biol Chem, 2018. **293**(1): p. 226-244.
42. Boiocchi, C., et al., *The Possible Involvement of HLA Class III Haplotype (RAGE, HSP70 and TNF Genes) in Alzheimer's Disease*. Curr Alzhcimer Res, 2015. **12**(10): p. 997-1005.
43. Giridharan, V.V., et al., *Schisandrin B ameliorates ICV-infused amyloid β induced oxidative stress and neuronal dysfunction through inhibiting RAGE/NF- κ B/MAPK and up-regulating HSP/Beclin expression*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142483.
44. Schindler, S.M., et al., *Pattern recognition receptors mediate pro-inflammatory effects of extracellular mitochondrial transcription factor A (TFAM)*. Mol Cell Neurosci, 2018. **89**: p. 71-79.

45. Kawahito, S., H. Kitahata, and S. Oshita, *Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(33): p. 4137-42.
46. Campos, C., *Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae*. Postgrad Med, 2012. **124**(6): p. 90-7.
47. Said, G., *Diabetic neuropathy—a review*. Nat Clin Pract Neurol, 2007. **3**(6): p. 331-40.
48. Vinik, A.I., et al., *Diabetic neuropathy*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2013. **42**(4): p. 747-87.
49. Vinik, A.I. and C.M. Casellini, *Guidelines in the management of diabetic nerve pain: clinical utility of pregabalin*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2013. **6**: p. 57-78.
50. Sadosky, A., et al., *Burden of illness associated with painful diabetic peripheral neuropathy among adults seeking treatment in the US: results from a retrospective chart review and cross-sectional survey*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2013. **6**: p. 79-92.
51. Kanavos, P., S. van den Aardweg, and W. Schurcx, *Diabetes expenditure, burden of disease and management in 5 EU countries*. LSE Health and Social Care, 2012.
52. Tamayo, T., et al., *Diabetes in Europe: an update*. Diabetes Res Clin Pract, 2014. **103**(2): p. 206-17.
53. Cameron, N.E. and M.A. Cotter, *Pro-inflammatory mechanisms in diabetic neuropathy: focus on the nuclear factor kappa B pathway*. Curr Drug Targets, 2008. **9**(1): p. 60-7.
54. Sandireddy, R., et al., *Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets*. Int J Endocrinol, 2014. **2014**: p. 674987.
55. Rahman, M.H., M.K. Jha, and K. Suk, *Evolving Insights into the Pathophysiology of Diabetic Neuropathy: Implications of Malfunctioning Glia and Discovery of Novel Therapeutic Targets*. Curr Pharm Des, 2016. **22**(6): p. 738-57.
56. Ramasamy, R., S.F. Yan, and A.M. Schmidt, *Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1243**: p. 88-102.
57. Ramasamy, R., S.F. Yan, and A.M. Schmidt, *Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go*. Amino Acids, 2012. **42**(4): p. 1151-61.
58. Faria, A. and S.J. Persaud, *Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential*. Pharmacol Ther, 2017. **172**: p. 50-62.
59. Sanajou, D., et al., *AGE-RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: Current status and future directions*. Eur J Pharmacol, 2018. **833**: p. 158-164.
60. Rabbani, N. and P.J. Thornalley, *Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease*. Kidney Int, 2018. **93**(4): p. 803-813.
61. Kumar Pasupulati, A., P.S. Chitra, and G.B. Reddy, *Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy*. Biomol Concepts, 2016. **7**(5-6): p. 293-309.
62. Ruiz, H.H., R. Ramasamy, and A.M. Schmidt, *Advanced Glycation End Products: Building on the Concept of the "Common Soil" in Metabolic Disease*. Endocrinology, 2020. **161**(1).
63. Litwinoff, E., et al., *Emerging Targets for Therapeutic Development in Diabetes and Its Complications: The RAGE Signaling Pathway*. Clin Pharmacol Ther, 2015. **98**(2): p. 135-44.
64. Calkin, A.C., et al., *The HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin and the angiotensin receptor antagonist candesartan attenuate atherosclerosis in an apolipoprotein E-deficient mouse model of diabetes via effects on advanced glycation, oxidative stress and inflammation*. Diabetologia, 2008. **51**(9): p. 1731-40.
65. Soro-Paavonen, A., et al., *Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(9): p. 2461-9.
66. Liu, Y., et al., *Blockade of receptor for advanced glycation end products protects against systolic overload-induced heart failure after transverse aortic constriction in mice*. Eur J Pharmacol, 2016. **791**: p. 535-543.

67. Lim, S., et al., *sRAGE attenuates angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy by inhibiting RAGE-NFkappaB-NLRP3 activation*. *Inflamm Res*, 2018. **67**(8): p. 691-701.
68. Goova, M.T., et al., *Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(2): p. 513-25.
69. Olekson, M.P., et al., *Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products Improves Stromal Cell-Derived Factor-1 Activity in Model Diabetic Environments*. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2016. **5**(12): p. 527-538.
70. Zeng, S., et al., *Blockade of receptor for advanced glycation end product (RAGE) attenuates ischemia and reperfusion injury to the liver in mice*. *Hepatology*, 2004. **39**(2): p. 422-32.
71. Lalla, E., et al., *Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(8): p. 1117-24.
72. Sanajou, D., et al., *FPS-ZM1 and valsartan combination protects better against glomerular filtration barrier damage in streptozotocin-induced diabetic rats*. *J Physiol Biochem*, 2018. **74**(3): p. 467-478.
73. Zhang, M., et al., *Blockade of receptors of advanced glycation end products ameliorates diabetic osteogenesis of adipose-derived stem cells through DNA methylation and Wnt signalling pathway*. *Cell Prolif*, 2018. **51**(5): p. e12471.
74. Lopez-Diez, R., et al., *Ager Deletion Enhances Ischemic Muscle Inflammation, Angiogenesis, and Blood Flow Recovery in Diabetic Mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(8): p. 1536-1547.
75. Ejdesjo, A., et al., *Receptor for advanced glycation end products (RAGE) knockout reduces fetal dysmorphogenesis in murine diabetic pregnancy*. *Reprod Toxicol*, 2016. **62**: p. 62-70.
76. McVicar, C.M., et al., *Role of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in retinal vasodegenerative pathology during diabetes in mice*. *Diabetologia*, 2015. **58**(5): p. 1129-37.
77. Rong, L.L., et al., *RAGE modulates peripheral nerve regeneration via recruitment of both inflammatory and axonal outgrowth pathways*. *FASEB J*, 2004. **18**(15): p. 1818-25.
78. Duran-Struuck, R. and R.C. Dysko, *Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2009. **48**(1): p. 11-22.
79. Cui, Y.Z., et al., *Optimal protocol for total body irradiation for allogeneic bone marrow transplantation in mice*. *Bone Marrow Transplant*, 2002. **30**(12): p. 843-9.
80. Weischenfeldt, J. and B. Porse, *Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications*. *CSH Protoc*, 2008. **2008**: p. pdb prot5080.
81. Wang, Z.Y., et al., *Localization of zinc-enriched neurons in the mouse peripheral sympathetic system*. *Brain Res*, 2002. **928**(1-2): p. 165-74.
82. Li, J.Y., et al., *Distribution of Rab3a in rat nervous system: comparison with other synaptic vesicle proteins and neuropeptides*. *Brain Res*, 1996. **706**(1): p. 103-12.
83. Chio, A., et al., *Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature*. *Neuroepidemiology*, 2013. **41**(2): p. 118-30.
84. Logroscino, G., et al., *Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010. **81**(4): p. 385-90.
85. Mitchell, J.D. and G.D. Borasio, *Amyotrophic lateral sclerosis*. *Lancet*, 2007. **369**(9578): p. 2031-2041.
86. Morgan, S. and R.W. Orrell, *Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis*. *Br Med Bull*, 2016. **119**(1): p. 87-98.
87. Nowicka, N., et al., *Risk Factors and Emerging Therapies in Amyotrophic Lateral Sclerosis*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(11).
88. Richardson, K., et al., *The effect of SOD1 mutation on cellular bioenergetic profile and viability in response to oxidative stress and influence of mutation-type*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e68256.

89. Capitanio, D., et al., *Molecular signatures of amyotrophic lateral sclerosis disease progression in hind and forelimb muscles of an SOD1(G93A) mouse model*. Antioxid Redox Signal, 2012. **17**(10): p. 1333-50.
90. Wu, D.C., et al., *The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(32): p. 12132-7.
91. Ding, Q. and J.N. Keller, *Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1746**(1): p. 18-27.
92. Chen, C., et al., *Abeta-AGE aggravates cognitive deficit in rats via RAGE pathway*. Neuroscience, 2014. **257**: p. 1-10.
93. Yan, S.D., et al., *RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease*. Nature, 1996. **382**(6593): p. 685-91.
94. Hofmann, M.A., et al., *RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides*. Cell, 1999. **97**(7): p. 889-901.
95. Ilzecka, J., *Serum-soluble receptor for advanced glycation end product levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis*. Acta Neurol Scand, 2009. **120**(2): p. 119-22.
96. Casula, M., et al., *Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue*. Neuroscience, 2011. **179**: p. 233-43.
97. Lautenschlager, J., et al., *Overexpression of human mutated G93A SOD1 changes dynamics of the ER mitochondria calcium cycle specifically in mouse embryonic motor neurons*. Exp Neurol, 2013. **247**: p. 91-100.
98. Parone, P.A., et al., *Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurosci, 2013. **33**(11): p. 4657-71.
99. Heiman-Patterson, T.D., et al., *Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)1Gur mouse model of ALS*. J Neurol Sci, 2005. **236**(1-2): p. 1-7.
100. Veldink, J.H., et al., *Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS*. Neuromuscul Disord, 2003. **13**(9): p. 737-43.
101. Calvo, A.C., et al., *Lack of a synergistic effect of a non-viral ALS gene therapy based on BDNF and a TTC fusion molecule*. Orphanet J Rare Dis, 2011. **6**: p. 10.

5. Prezentacja znaczącej działalności naukowej lub artystycznej prowadzonej na więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub kulturalnej, w szczególności w instytucjach zagranicznych

Podsumowanie ogólnej działalności badawczej

Układ nerwowy - jego budowa, funkcja, rozwój i patologia, od wczesnych lat stanowiły moje główne zainteresowanie naukowe. Na wszystkich etapach mojej kariery naukowej, począwszy od stażu naukowego w Katedrze Anatomii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, poprzez studia doktoranckie z zakresu neuronauki (Neuroscience) rozwojowej i stosowanej, realizowane zarówno w Polsce, na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim jak i w kilku instytucjach zagranicznych, tj. Instytucie Maksa Plancka w Getyndze, w Instytucie Neuroanatomii na Wydziale Medycznym, Charite, w Berlinie, Niemcy, oraz w Centrum Biomedycznym Uniwersytetu Lund, w Lund, Szwecja, poprzez staże podoktorskie na Uniwersytetach Columbia i Uniwersytecie Nowojorskim, w Nowym Jorku, USA. Nieustannie dążyłam do pogłębiania mojej wiedzy na temat układu nerwowego, stopniowo przechodząc od badań w obrębie nauk podstawowych, dotyczących budowy, do badań skierowanych na poznanie patomechanizmów chorób układu nerwowego.

Przez wiele lat współpracowałam i dalej współpracuję w wielu projektach translacyjnych z czołowymi eksperymentatorami, takimi jak prof. Reinhard Jahn i Thomas Sudhof (laureat Nagrody Nobla z 2013 r.) z Instytutu Maksa Plancka w Getyndze, Niemcy i Uniwersytetu Stanforda w Stanford, Kalifornia, USA.; prof. Jia Yi Li i prof. Patrik Brundin, Wallenberg Neuroscience Center, Uniwersytet w Lund, Szwecja; Prof. Gudrun Ahnert-Hilger, Institute of Integrative Neuroanatomy, Charite, Universitätsmedizin, Berlin, Niemcy; Prof. Thomas Brannagan, Department of Neurology, Columbia University Medical Center, Nowy Jork, NY, USA oraz dr hab. Marta Banach, Klinika Neurologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Wczesna współpraca w projektach międzywydziałowych i międzynarodowych

Moją pierwszą współpracę w projekcie międzynarodowym rozpoczęłam na pierwszym roku studiów doktoranckich, dzięki uzyskaniu rocznego stypendium Marie Curie na Wydziale Neurobiologii Instytutu Chemii Biofizycznej im. Maksa Plancka w Getyndze, Niemcy. Głównym celem stypendium było opanowanie zestawu umiejętności potrzebnych do prowadzenia samodzielnych badań równoległe z realizacją mojego projektu doktorskiego rozpoczętego na macierzystej uczelni. Przez pierwsze trzy miesiące uczestniczyłam w pilotażowych badaniach właściwości egzocytotycznych komórek neuroendokrynych PC12 - modelowych komórek w badaniach neuronalnych. Badania te wymagały szeroko zakrojonej hodowli komórkowej, a także zastosowania zaawansowanych technik mikroskopowych opracowanych w laboratorium prof. Jahna, mojego mentora w Instytucie Maksa Plancka (<https://www.mpibpc.mpg.de/jahn>). Udział w niniejszych badaniach pozwolił mi na uzyskanie podstawowych umiejętności niezbędnych do prowadzenia udanych hodowli komórkowych i dał wyjątkową okazję do uzyskania wglądu w mało znaną na mojej macierzystej Uczelni technikę obrazowania żywych komórek przed i po przerwaniu błony komórkowej oraz w trakcie egzocytozy. Wyniki badań pilotażowych zostały zaprezentowane na seminarium instytutowym, w Instytucie Maksa Plancka w 2003 roku. Kolejne badania, realizowane przez następne 9 miesięcy w tym samym laboratorium, w Instytucie Maksa Plancka miały na celu określenie rozmieszczenia synaptycznych białek strefy aktywnej (Active Zone) tj. Piccolo, Bassoon, Rim1a, Munc13-1, Liprin α3 i ELKS2 w obwodowym układzie nerwowym. Białka AZ (strefy aktywnej), są zaangażowane w uwalnianie neuroprzekaźników w synapsach chemicznych i odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania synapsy. W badaniach gryzoni, nicieni (*C. elegans*) oraz muszek owocowych, wykazano, iż usunięcie kodujących je genów prowadzi do zaburzeń funkcjonowania układu nerwowego, ciężkich schorzeń neurologicznych u dorosłych osobników i/lub poważnych wad letalnych u płodów [102-104]. Przypuszcza się, iż dezaktywacja lub mutacja w obrębie genów kodujących białka z tej grupy może prowadzić do ciężkich schorzeń neurologicznych i psychicznych u ludzi [105-108]. Wykazano na przykład, iż geny kodujące dwa z białek: Piccolo i Rim, ulegają nadekspresji w ciele migdałowatym u pacjentów ze schizofrenią [109], z kolei badania ekspresji Piccolo, Bassoon i Munc13 w chorobie Huntingtona ujawniły zmianę rozmieszczenia i redystrybucję tych białek z cytoplazmy oraz obszaru synapsy do jądra komórkowego i tworzenie agregatów komórkowych ze zmutowanym białkiem huntingtin, będącym kluczowym w patogenezie tej choroby [105]. Podobnie, wykryto również niż ekspresja Rim1 jest zwiększona w płacie czołowym pacjentów z padaczką oraz modelu zwierzęcym tego zaburzenia [110].

Wstępne wyniki badań zostały zaprezentowane podczas seminarium instytutowego w 2004 r., na konferencjach w 2005 i 2006 r. wyszczególnionych w wykazie dorobku naukowego oraz opublikowane w: **J. Juranek**, K. Mukherjee, M. Rickmann, H. Martens, J. Całka, T. Sudhof, R. Jahn (2006). *Differential expression of active zone proteins in neuromuscular junctions suggests functional diversification*. *Eur. J. Neurosci.* 24(11): 3043-3052

Badania nad rolą białek AZ rozpoczęte w czasie pobytu na stypendium w Instytucie Maksa Plancka, stały się integralną częścią mojej pracy doktorskiej i pozwoliły mi na uzyskanie krótkoterminowego prestiżowego stypendium EMBO (European Molecular Biology Organisation), które odbyłam w Wallenberg Neuroscience Center, Department of Biomedical Research na Uniwersytecie w Lund w Szwecji. W Wallenberg Neuroscience Center pracowałam pod kierunkiem prof. Jia Yi Li, gdzie opanowałam podstawy techniki stop-flow oraz ligacji (podwiązania) nerwów obwodowych w badaniach transportu aksonalnego. Głównym celem stosowania techniki stop-flow jest zatrzymanie przepływu cząsteczek i pęcherzyków transportowych przemieszczających się wzdłuż osi aksonu w obu kierunkach (antero i retrogradowym) zatrzymując przepływ, można ocenić tempo - wolne lub szybkie, a także stopień transportu różnych białek w obrębie aksonów; technika ta umożliwia ponadto ocenę stopnia ich ponownego wykorzystania. Opanowanie powyższej techniki stanowiło punkt wyjścia mojej aplikacji do laboratorium prof. Ann Marie Schmidt na Uniwersytecie Columbia oraz stanowiło ważny element przyszłych, własnych badań, stając się jednym z kluczowych punktów otrzymanego przeze mnie 5-letniego grantu badawczego SONATA BIS rozpoczętego w lipcu 2019 roku. Prof. Jia Yi Li, który jest profesorem na Uniwersytecie w Lund, w ostatnich latach otrzymał również tytuł profesora na China Medical University, Shenyang, Chiny i obecnie pracujemy wspólnie nad aplikacją do ogłoszonego w styczniu tego roku przez Narodowe Centrum Nauki (NCN, Polska) i Narodową Fundację Nauk Przyrodniczych (NSFC, Chiny) konkursu naukowego SHENG 2 – na dofinansowanie wspólnych polsko-chińskich badań z zakresu nauk medycznych.

Oprócz pracy nad białkami AZ uczestniczyłam również w projekcie naukowym prowadzonym pod kierunkiem prof. Gudrun Ahnert-Hilger w Charite – Universitatmedizin, dotyczącym białek G - konkretnie Go1a i Go2a, należących do rodziny GTPaz klasy Go. Białka te odgrywają rolę w magazynowaniu neuroprzekazników, zwłaszcza monoamin takich jak dopamina w pęcherzykach synaptycznych oraz są niezbędne w regulacji ich wydzielania, modulując odpowiedzi neuronów na leki dopaminoergiczne i psychostymulujące. Moim głównym zadaniem w projekcie było przygotowywanie oraz wybarwienie immunofluorescencyjnie tkanki mózgowej pobranej od myszy „dzikich” (kontrola) oraz z usuniętymi genami kodującymi Go, a następnie analiza uzyskanych danych w celu oceny różnic w ekspresji poszczególnych białek Go między kontrolą a myszami z pozbawionymi genów kodujących Go1a i Go2a. Częściowe rezultaty mojej współpracy przy projekcie zostały opublikowane tutaj: I Brunk, C Blex, C Sanchez-Segura, J Sternberg, S Perreau-Lenz, A Bilbao, H. Hörtnagl, J Baron, **J Juranek**, G Laube, L Birnbaumer, R Spanagel, G Ahnert-Hilger (2008) *Deletion of Go2a abolishes cocaine-induced behavioral sensitization by disturbing the striatal dopamine system. The FASEB Journal* 22: 3736-3746. Kolejna praca jest w przygotowaniu.

Współpraca naukowa podczas pracy naukowej za granicą

Mimo iż, główna część mojej pracy na stażu podoktorskim najpierw na Uniwersytecie Columbia, a później na Uniwersytecie Nowojorskim oraz, później, na stanowisku starszego naukowca, na Uniwersytecie Nowojorskim obracała się wokół RAGE, stając się częścią mojego osiągnięcia habilitacyjnego, nawiązałam również i/lub utrzymałam owocną współpracę z naukowcami z Polski oraz zagranicy. Moja współpraca skupiała się wokół trzech, przedstawionych poniżej, podstawowych tematów.

1. Pochodzenie i kodowanie neurochemiczne neuronów wybranych autonomicznych jąder i zwojów świni domowej
2. Patofizjologia neuropatii obwodowych
3. Dystrybucja i transport aksonalny białek synaptycznej strefy aktywnej

I. Pochodzenie i kodowanie neurochemiczne neuronów wybranych autonomicznych jąder i zwojów świni domowej

1. J Wojtkiewicz, **JK Juranek**, I Kowalski, M Bładowski, J Całka, M Majewski (2011) *Immunohistochemical characterization of superior cervical ganglion neurons supplying porcine parotid salivary gland. Neurosci Lett.* 500 (1): 57-62.
2. **JK Juranek**, J Wojtkiewicz (2015). *Origins and neurochemical complexity of the superior cervical ganglion preganglionic neurons in the domestic pig. J Mol Neurosci.* 55(2):297-304.
3. Barczewska M, **Juranek J**, Wojtkiewicz J (2017) *Origins and Neurochemical Characteristics of Porcine Intervertebral Disc Sympathetic Innervation: a Preliminary Report. J Mol Neurosci.* 63:50-57

Pierwsza część projektu obejmowała badanie neurochemicznego kodowania neuronów zwoju szyjnego górnego (SCG, superior cervical ganglion) zaopatrujących śliniankę przyuszną świni domowej. Świnia domowa należy do zwierząt zyskujących na popularności w nauce ze względu na zbliżone do człowieka rozmiary narządów wewnętrznych, podobną fizjologię oraz patofizjologię. SCG należy do układu współczulnego unerwiającego mięśnie i narządy głowy oraz stanowi główne źródło unerwienia ślinianki przyusznej, największego ze wszystkich gruczołów ślinowych człowieka oraz świni domowej [111]. W badaniach tkanek ludzkich oraz pochodzących od zwierząt laboratoryjnych, wykazano, iż najczęściej występującym w SCG enzymem jest hydroksylaza tyrozyny (TH), związana z metabolizmem katecholamin, neuroprzekaźników typowych dla układu współczulnego takich jak adrenalina i noradrenalina oraz dopaminy, typowej dla ośrodkowego układu centralnego [112]. Oprócz TH, w badaniach na tkankach pobranych od ludzi oraz laboratoryjnych gryzoni w neuronach SCG wykrywane były również inne substancje, jednak do czasu naszych badań pochodzenie oraz kodowanie neurochemiczne neuronów SCG u świni nie zostały poznane. W celu ustalenia morfologii i kodowania neurochemicznego SCG do ślinianki przyusznej wstrzyknięto znacznik aksonalnego transportu retrogradowego Fast Blue (FB), następnie, po trzech tygodniach od podania FB, pobrano próbki oraz wybarwiono na obecność różnych neuropeptydów i enzymów metabolizujących neuroprzekaźniki. Uzyskane wyniki wykazały, iż podobnie jak w SCG pobranych od ludzi i gryzoni, SCG świń ma charakter współczulny, wykazując obecność TH we wszystkich wyznakowanych FB neuronach. Oprócz TH, w większości (~91%) wyznakowanych neuronów, wykryto również kalbindynę; niewielka liczba neuronów (~0,8 - 2,6%) wykazała również obecność neuropeptydu Y, LENK (Leu-enkefalina) oraz galaniny, peptydów związanych z funkcjonowaniem układu trawiennego i obecnych w wielu neuronach jelitowego układu nerwowego (enteric nervous system). Duża obecność kalbindyny w neuronach TH-dodatnich podkreśla rolę tego neuropeptydu w utrzymywaniu aktywności wydzielniczej SCG, podczas gdy obecność neuropeptydu Y, LENK lub galaniny może świadczyć o tym, iż substancje te są zaangażowane w regulację przepływu krwi i wydzielania śliny, potwierdzając obserwacje pochodzące z badań nad unerwieniem ludzkich ślinianek [113]. Nasze badania wykazały, iż niewielka (~1%) część populacji FB-pozytywnych neuronów nie wykazała obecności TH, nie zaobserwowano również obecności acetylotransferazy choliney (ChAT), zaangażowanej w metabolizm acetylocholiney, co sugeruje, iż neurony te prawdopodobnie należą do populacji neuronów nieadrenergicznych i niecholinergicznymi (NANC, non- adrenergic, non-cholinergic), uzupełniając aktywność wydzielniczą ślinianki przyusznej i przyczyniając się do jej odpowiedzi dotyczącej produkcji śliny.

Druga część projektu stanowiła kontynuację wcześniejszych badań nad SCG i dotyczyła chemicznego kodowania i pochodzenia neuronów przedzwojowych zaopatrujących ten właśnie zwój. SCG jest głównym zwojem współczulnym zaopatrującym wszystkie narządy głowy i szyi, nie tylko gruczoły ślinowe, ale również szyszynkę, kłębek szyjny, spłot naczyniówkowy, oczy,

gruczoły łzowe, układ naczyniowy mózgu oraz mięśni czaszki. Odgrywa kluczową rolę w funkcjonowaniu tych narządów. Jak wspomniano wcześniej, uznaje się, iż neurony SCG są TH-dodatnie, katecholaminergiczne, jednak do czasu naszych badań pochodzenie oraz neurochemiczne kodowanie neuronów SCG u świni nie było dokładnie znane. W opisanym projekcie, znacznik FB został wstrzyknięty bezpośrednio do zwoju, wyznakowując wstecznie neurony pochodzące z segmentów C5 do Th8 rdzenia kręgowego. Po pobraniu i przygotowaniu materiału do badań, tkanki wybarwiono na obecność ponad 12 różnych substancji neurochemicznych takich jak NOS (syntetaza tlenku azotu), LENK, neuropeptyd Y, dynorfina, alfa-endorfina, kalbindyna, galanina, ChAT, serotonina, cholecystokinina, alfa-neoendorfina, CART (transkrypt regulowany kokainą i amfetaminą), VAcHT (pęcherzykowy transporter acetylocholino), PACAP-27 i innych.

Wyniki wykazały, iż większość włókien przedzwojowych zaopatrujących SCG pochodzi głównie z pierwszych trzech segmentów rdzenia kręgowego (Th1-3), w większości z istoty pośrednio-bocznej kręgosłupa. Zaobserwowane wyniki mają znaczenie kliniczne, jak wynika bowiem z dotychczasowych badań, uszkodzenie rdzenia kręgowego w obszarze środkowo-bocznym zaburza funkcję SCG, prowadząc do dysfunkcji sercowego, naczyniowego i oddechowego układu autonomicznego [114, 115]. Prowadzone badania wykazały również, iż u pacjentów z rodzinną dysautonomią (zespół Riley'a-Daya), u których występują nieprawidłowości morfologiczne w obrębie segmentów Th1-3 rdzenia kręgowego, także SCG jest znacznie zmniejszonych rozmiarów, a sami pacjenci często wykazują objawy wskazujące na zaburzenia związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem SCG takie jak: częste wymioty, nadciśnienie labilne, problemy z rogowką i trudności w połknięciu i podobne [116]. Uzyskane przez nas wyniki podkreślają złożoność neurochemicznego kodowania neuronów przedzwojowych SCG, wskazując na istotną rolę tego zwoju w funkcjonowaniu wielu narządów wewnętrznych oraz struktur znajdujących się w obrębie głowy, szyi i klatki piersiowej.

Trzecia część projektu obejmowała określenie pochodzenia oraz ocenę zmienności ekspresji neuropeptydów oraz neuroprzekaźników w zwojach współczulnych zaopatrujących krążki międzykręgowce po uprzednim odwodnieniu (dehydratacji) jądra miażdżystego krążków, tym samym odzwierciedlając częste zmiany patologiczne towarzyszące chorobom krążków międzykręgowych (intervertebral disc diseases, IVDD). W badaniach tych, podobnie jak we wcześniejszych częściach projektu, użyto znacznika FB do oznaczenia neuronów zwojowych pnia współczulnego (SCG) zaopatrujących krążki międzykręgowce. SCG pobierano 2 tygodnie, 1 miesiąc i 3 miesiące po wstrzyknięciu FB i barwiono w kierunku szeregu neuropeptydów i enzymów neuroprzekaźnikowych. Badania wykazały, że wzorce ekspresji neurochemicznej różnią się w zależności od czasu, jaki upłynął od odwodnienia krążków i podaniu znacznika. Najwyższe obniżenie ekspresji badanych substancji w porównaniu z kontrolą zaobserwowano 2 tygodnie oraz 3 miesiące po podaniu znacznika, a najniższe 1 miesiąc, wyznaczając prawdopodobnie najbardziej optymalny przedział czasu na wykonanie przeszczepów czy podaż leków po urazie krążka międzykręgowego. Uzyskane wyniki mają znaczenie kliniczne, ponieważ IVDD stanowią jedne z najczęstszych zaburzeń kręgosłupa występujących u osób w wieku 60 lat i starszych [117, 118]. Wyniki mogą stanowić podstawę kliniczną do określenia czasu terapii regeneracyjnej po urazie/wypadnięciu czy przepuklinie dysku, a także służyć jako wskaźnik zmian neurochemicznych w miejscu neurodegeneracji.

Potencjał diagnostyczny i terapeutyczny prezentowanych badań, choć trudny do oceny na wczesnym etapie projektu, stał się oczywisty w ostatnich latach wraz z rosnącym zainteresowaniem ze strony placówek prowadzących badania kliniczne oraz firm farmaceutycznych prowadzących badania nad świnią domową, bliżej anatomicznie i fizjologicznie spokrewnioną z człowiekiem niż powszechnie stosowane w laboratorium gryzonie. Niedawna

ukazała się kolejna publikacja tym razem dotycząca roli unerwienia autonomicznego w chorobach układu pokarmowego przeprowadzona we współpracy z dr hab. Michałem Zaleckim z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej dotycząca odpowiedzi galaninerгіcznej zwoju nerwu błędnego dolnego (guzowatego) na owrzodzenia żołądka, potwierdzająca rosnące zainteresowanie tematem: Zalecki M, **Juranek J**, Pidsudko Z, Mogielnicka-Brzozowska M, Kaleczyc J, Franke-Radowiecka A *Inferior vagal ganglion galaninerгіc response to gastric ulcers*. PLoS One. 2020 Nov 23;15(11):e0242746.

2. Patofizjologia neuropatii obwodowych

1. **JK Juranek**, M Banach (2015) *The role of RAGE in diabetic neuropathy*. *Family Medicine and Primary Care Review* 17 (4): 316-318
2. M Banach, **JK Juranek**, J Antczak (2015) Drug induced neuropathies. *Family Medicine & Primary Care Review* 17 (4): 284-288
3. Banach M, **Juranek JK**, Zygulska AL (2016) *Chemotherapy-induced neuropathies-a growing problem for patients and health care providers*. *Brain Behav*. 26;7(1):e00558.
4. Banach M, Rakowicz M, Rola R, Antczak J, **Juranek JK**, Krys W, Sulek A (2017) *Peripheral nerve lesions in patients with myotonic dystrophy types 1 and 2*. *Przegl Lek*. 74 (12), 643-647

Głównym celem niniejszej współpracy było połączenie wiedzy oraz doświadczenia medyczno-naukowego w badaniach patofizjologii, profilaktyki i leczeniu neuropatii obwodowych.

Celem pierwszego wspólnego projektu przygotowanego we współpracy z dr hab. Martą Banach z Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego było zebranie dotychczasowej wiedzy na temat RAGE oraz jego roli w patogenezie neuropatii cukrzycowej. W publikacji przedstawiono najnowsze informacje dotyczące RAGE oraz obwodowej neuropatii cukrzycowej; podkreślając podwójną, zarówno pozytywną jak i negatywną rolę RAGE w układzie nerwowym, jego szerokie funkcje, wynikające z wchodzenia w interakcje z wieloma ligandami stresu oksydacyjnego oraz zapalenia oraz udział RAGE w wyzwalaniu i/lub nasileniu zaburzeń neuronalnych i postępującego neurozwyrodnienia.

Pod kierunkiem dr hab. Marty Banach miałam okazję zapoznać się z metodą pomiarów elektrofizjologicznych i zinterpretować ich wyniki w celu wykrycia zmian szybkości przewodzenia w nerwach obwodowych (łokciowych, piszczelowych) u osób chorujących na cukrzycę. Poznałam również fachową wiedzę na temat innych rodzajów neuropatii towarzyszących innym, niż cukrzyca, schorzeniom lub powstających na skutek neurotoksyczności leków stosowanych w określonych terapiach np. terapii nowotworowej. Efektem naszej współpracy była seria publikacji dotycząca neuropatii i zmian patologicznych w nerwach obwodowych rozpoznawanych u pacjentów Szpitala Akademickiego Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Jedną z publikacji dotyczyła często pomijanego zagadnienia neurotoksyczności leków w terapiach nowotworowych, chorób autoimmunologicznych czy chorób układu krążenia. Neurotoksyczność jest jednym z najczęściej występujących, długotrwałych skutków ubocznych wielu powszechnie stosowanych leków, powodując dysfunkcję nerwów obwodowych i osłabiając skuteczność terapii [119, 120]. Ilość leków o działaniu neurotoksycznym wciąż rośnie, mimo iż są to specyfiki z grupy podstawowych medykamentów znajdujących się na liście Światowej Organizacji Zdrowia. Przykłady obejmują leki stosowane w leczeniu: zaburzeń autoimmunologicznych (etanercept, infliksymab, leflunomid), chorób układu krążenia/nadciśnienia (statyny, amiodaron); choroby zakaźne (nitrofurantoina, metronidazol, izoniazyd), leki przeciwdrgawkowe (fenytoina) i chemioterapeutyki przeciwnowotworowe (talidomid, bortezomib, oksaliplatyna, cisplatyna, suramina, paklitaksel, winkrystyna i inne) [121]. Wczesne wykrycie wywołanych przez określone specyfiki zaburzeń związanych z neurotoksycznością ma ogromne znaczenie kliniczne, umożliwia bowiem wczesną interwencję i optymalizację metody terapii, z wykluczeniem lub zastąpieniem stosowanego leku substancją o mniejszych skutkach ubocznych, ma również kluczowe znaczenie w zapobieganiu nieodwracalnym uszkodzeniom nerwów obwodowych, kończących się w

najcięższych przypadkach niepełnosprawnością ruchową. W publikacji opisaliśmy etiologię i patomechanizm neurotoksyczności powodowanej lekami, prowadzącej do rozwoju neuropatii obwodowych. Większość zaburzeń patologicznych wynikających z neurotoksyczności obserwuje się w aksonach i diagnozowanych jako aksonopatie czuciowo-ruchowe, znacznie mniej wyraźne są zmiany dotyczące osłonki mielinowej lub neuronów czuciowych zwojowych diagnozowane jako neuronopatie mielinowe lub czuciowe zwojów nerwowych. Kliniczne objawy neurotoksyczności polekowej zależą od miejsca i obejmują między innymi: stopniową utratę czucia w dłoniach i stopach, mrowienie, parestezje, trudności w chodzeniu, zanik mięśni, arefleksja, kłucie i pieczenie kończyn oraz ból neuropatyczny. Pomiarzy elektrofizjologiczne nie wykazują zazwyczaj zmian prędkości przewodzenia nerwów, obserwuje się jednak zmniejszone amplitudy w aksonopatiach, wydłużoną latencję w mielinopatiach oraz zmniejszenie amplitudy i obniżony potencjał czynnościowy w nerwach czuciowych [122].

Kolejna publikacja powstała we współpracy z dr hab. Martą Banach miała na celu dokładniejsze opisanie szczegółów dotyczących neuropatii wywołanych chemioterapią, ich diagnostyki, profilaktyki oraz leczenia. Chemioterapeutyki to klasa leków stosowanych przede wszystkim w leczeniu nowotworów. Te silne związki chemiczne czasami określane jako wewnątrzkomórkowe trucizny są szkodliwe nie tylko dla komórek nowotworowych, ale także dla innych komórek organizmu, często wywierając toksyczny wpływ na komórki neuronalne i glijowe [123]. Szacowany wskaźnik neuropatii wywołanych chemioterapią waha się od 20% w przypadku niektórych substancji, takich jak alkaloidy vinca lub bortezomib, stosowanych w leczeniu raka płuc, mózgu, pęcherza moczowego lub szpiczaka mnogiego, do 70-100% w przypadku leków na bazie platyny, takich jak oksaliplatyna, cisplatyna i karboplatyna, wymienionych na liście leków podstawowych Światowej Organizacji Zdrowia i stosowanych w leczeniu wielu różnych nowotworów, np. guzów płuc, jajników, pęcherza, komórek zarodkowych, jąder i jelita grubego [124]. Techniki diagnostyczne stosowane do wykrywania neurotoksycznych skutków leczenia na nerwy obwodowe obejmują standardowe badanie elektrofizjologiczne, biopsje nerwów, ilościowe badanie sensoryczne, konfokalną mikroskopię rogówki oraz neurografię rezonansu magnetycznego. Ponadto z powodzeniem można również zastosować podejście farmakogenetyczne do identyfikacji pacjentów z wyższym ryzykiem rozwoju neuropatii polekowej i dzięki temu odpowiednio zmodyfikować leczenie. W publikacji postawiliśmy również otwarte pytanie - co możemy zrobić, aby zapobiec lub przynajmniej złagodzić objawy neuropatii obwodowych u pacjentów chorujących oraz wyleczonych z choroby nowotworowej, którzy oprócz walki z pierwotną chorobą doświadczają objawów wywołanych lekami neurotoksyczności. Opierając się na naszym wspólnym doświadczeniu i wiedzy, zaleciliśmy wdrożenie ścisłej współpracy między onkologami, lekarzami pierwszego kontaktu i neurologami w zakresie standardowej opieki nad pacjentami onkologicznymi, a także rewizję istniejących protokołów leczenia nowotworów, tak by uwzględniały one dostępne dane dotyczące neurotoksycznego wpływu wybranych chemioterapeutyków.

Ostatnia publikacja będąca efektem wieloletniej współpracy z dr hab. Martą Banach przedstawia wyniki wieloletniego projektu dotyczącego uszkodzeń nerwów obwodowych u pacjentów z dystrofią miotoniczną (MD) typu 1 i 2. Dystrofia miotoniczna jest autosomalnie dominującą chorobą genetyczną należącą do grupy zaburzeń nerwowo-mięśniowych. Objawy kliniczne obejmują miotonię i dysfunkcję mięśni, a także powikłania wieloukładowe, w niektórych przypadkach objawiające się również hiperglikemią i pewnym stopniem upośledzenia funkcji poznawczych [125]. Celem pracy było ustalenie częstości występowania i przedstawienie elektrofizjologicznej charakterystyki nieprawidłowości nerwów obwodowych u pacjentów z MD1 lub MD2. Wszyscy pacjenci wyrazili zgodę na badanie i zostali poddani badaniu klinicznemu oraz elektrofizjologicznemu. Wyniki badania ujawniły, że zaburzenia nerwów obwodowych są dość częste u pacjentów z dystrofią miotoniczną, z wyraźnymi objawami neuropatii obwodowej u jednej trzeciej wszystkich pacjentów z MD1 i jedną czwartą wszystkich pacjentów z MD2, wpływając na ich samopoczucie fizyczne oraz zwiększając dyskomfort. Osłabienie i atrofia mięśni były najczęstszymi objawami obserwowanymi w obu grupach pacjentów, u niektórych pacjentów

obserwowano dodatkowo również nadmierne, dokuczliwe pocenie się dłoni i tułowia oraz bóle mięśniowo-szkieletowe. U wszystkich pacjentów z objawami neuropatii badanie elektrofizjologiczne wykazało wyraźne objawy aksonopatii. Uzyskane dane wykazały dużą częstotliwość występowania zaburzeń nerwów obwodowych u pacjentów z dystrofią miotoniczną oraz wskazały na potrzebę włączenia badania neurologicznego i elektrofizjologicznego do leczenia pacjentów z tą wyniszczającą chorobą.

3. Dystrybucja i transport aksonalny białek synaptycznej strefy aktywnej

1. **JK Juranek**, K Mukherjee, T Siddiqui, B Kaplan, JY Li, G Ahnert-Hilger, R Jahn, J Calka (2013). *Active Zone protein expression changes at key stages of cerebellar cortex neurogenesis in the rat. Acta Histochemica* 115(6):616-625
2. **JK Juranek**, MS Geddis, P Kothary, A Hays, AM Schmidt, TH Brannagan (2013) *Expression of Munc13-1 is reduced in human and porcine diabetic peripheral nerve. Acta Histochemica* S0065-1281(13)00109-8

Głównym celem niniejszego projektu było ustalenie ekspresji białek strefy aktywnej (AZ) podczas synaptogenezy. Projekt stanowił kontynuację badań doktorskich i był realizowany we współpracy z naukowcami, których poznałam podczas studiów doktoranckich w Polsce i za granicą.

Jak wspomniano we wcześniejszej części, białka AZ są częścią mechanizmu uwalniania neuroprzekazników w aktywnej strefie synapsy chemicznej. Białka AZ, do których należy Piccolo/Aczonin, Bassoon, RIM1/Unc10, Munc13/Unc13, Liprin- α /SYD2/Dliprin i ELKS/CAST/BRP stanowią elementy cytoszkieletu w obrębie synaptycznej strefy aktywnej i odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu jej struktury oraz koordynowaniu uwalniania neuroprzekazników z pęcherzyków synaptycznych [126]. Chociaż ekspresja tych białek w dojrzałych neuronach została dobrze poznana, niewiele wiadomo o dynamice ich ekspresji podczas synaptogenezy. Projekt miał na celu ocenę czasowego i przestrzennego rozmieszczenia białek AZ w rozwijającym się ośrodkowym układzie nerwowym ssaków. Wszystkie analizy przeprowadzono na mózdku szczura w okresie poporodowym. Mózdzek, dzięki swojemu unikalnemu mechanizmowi rozwoju w okresie około i pourodzeniowym stanowił idealny model do czasowego i przestrzennego obserwowania ekspresji białek AZ oraz oceny ich roli w procesach neuro- i synaptogenezy. Ogólnie przyjęto, że proces formowania synaps oraz powstawania synaptycznej strefy aktywnej nie jest pojedynczym procesem, a raczej złożonym wielotorowym mechanizmem. Dwa najczęściej sugerowane modele powstawania synaptycznej strefy aktywnej to połączenie modelu „prefabrykacji” i modelu „sekwencyjnego”. Zgodnie z pierwszym, białka AZ docierają do AZ wstępnie zmontowane i zapakowane w pęcherzyki transportowe, podczas gdy w drugim modelu przemieszczają się w cytozolu w uporządkowany sposób [127]. W niniejszym projekcie, naszym celem było zebranie większej ilości danych potwierdzających lub odrzucających ten model powstawania synapsy. W badaniu wykorzystano czterdzieści szczurów rasy Wistar, podzielonych na 5 grup po urodzeniu. Grupy zostały wyznaczone zgodnie z opisanymi tu etapami rozwoju mózdku i wyglądały następująco: dzień po urodzeniu (PD) 1, PD 5, PD 10, PD 15, PD 20 i PD 25. Wyniki badań wykazały obecność AZ białka już we wczesnych stadiach neuro- i synaptogenezy, wykazujące odrębne przestrzenne i czasowe wzorce ekspresji w rozwijającym się mózdku. Wszystkie białka były już obecne w PD1, jednak ich ekspresja nie była dobrze zaznaczona, przy PD5 odnotowano bardziej intensywne, punktowe znakowanie, które osiągało szczyt intensywności przy PD15 i stabilizowało się przy PD20, przypominając to obserwowane w dojrzałym mózdku. Różne białka wykazywały różne wzory barwienia - w warstwie komórek ziarnistych mózdku lipryna, ELKS i RIM prezentowały bardziej ziarnisty wzór, podczas gdy barwienie Piccolo, Bassoon i Munc13 było bardziej punktowe, a w warstwie molekularnej zaobserwowano punktowe wybarwienie dla wszystkich białek. Wyniki wykazały również, że białka te nie są równomiernie rozmieszczone we frakcjach cytozolowych i organellach komórek mózdku, wykazując wysoką akumulację we frakcjach organellarnych zawierających olbrzymie organelle i rozerwane komórki (frakcja II), jądra i małe organelle (P1), błony

komórkowe (S1) wakuole, aparat ER i Golgiego (P2), ale z wyjątkiem lipryny – żadne inne białko nie było obecne we frakcji cytozolowej (S2). Uzyskane wyniki dostarczyły dowodów na poparcie połączonego modelu formowania AZ i uitorowały drogę do dalszych, trwających nadal badań nad zmianami ekspresji i transportu białek AZ (publikacja w trakcie przygotowania)

Innym, drugorzędym celem projektu było zbadanie transportu aksonalnego niektórych białek AZ w warunkach choroby, w tym przypadku neuropatii cukrzycowej. Badania wykazały, iż niektóre białka cytoszkieletu, takie jak Munc13-1 (ssaczy homolog *C. elegans* unc-13), mogą również brać udział w patogenezie neuropatii cukrzycowej. Munc13-1, opisywany jako receptor diacyloglicerolu/estru forbolu, poza jego rolą w formowaniu pęcherzyków neurosynaptycznych oraz wydzielaniu neuroprzekaźników, jest jednym z głównych czynników ograniczających uwalnianie insuliny i wychwyt glukozy u pacjentów z cukrzycą typu 2 [128]. Ponadto dowody wskazują, iż Munc13-1 bierze również udział w trzustkowym wydzielaniu insuliny *in vitro*, regulując ilość pęcherzyków zawierających insulinę [129]. Ekspresję Munc13-1 zbadano w nerwach obwodowych człowieka oraz świni z wywołaną chemicznie cukrzycą typu 1. W przypadku części ludzkiej wykorzystano nadwyżkę tkanki biopsyjnej pobranej od przewlekle leczonych pacjentów z cukrzycą przyjętych do Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Columbia, a w części świńskiej 6-miesięcznych samic świni Yorkshire z cukrzycą, którym wstrzyknięto STZ. Wszystkie procedury zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną (Institutional Review Board i Institutional Animal Care and Use Committee). Wyniki ujawniły, że Munc13-1 był znacznie zmniejszony w obwodowym nerwie cukrzycowym zarówno w próbkach ludzkich, jak i świńskich w porównaniu z kontrolami, co wykazano zarówno metodami immunofluorescencyjnymi, jak i poprzez immunoblotting. Uzyskane wyniki sugerują, iż obserwowany spadek ekspresji Munc13-1 może wpływać na liczbę gotowych do uwolnienia puli pęcherzyków zawierających insulinę i że w połączeniu z Munc13-1 zmniejszona obecność w tkance nerwowej może, wraz z innymi czynnikami, przyczynić się do wywołanych hiperglikemią zmian neuropatologicznych prowadzących do rozwoju neuropatii cukrzycowej.

Piśmiennictwo uzupełniające (punkt 5)

102. Augustin, I., et al., *Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles*. Nature, 1999. **400**(6743): p. 457-61.
103. Kaufmann, N., et al., *Drosophila liprin-alpha and the receptor phosphatase Dlar control synapse morphogenesis*. Neuron, 2002. **34**(1): p. 27-38.
104. Wagh, D.A., et al., *Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in Drosophila*. Neuron, 2006. **49**(6): p. 833-44.
105. Huang, T.T., et al., *No symphony without bassoon and piccolo: changes in synaptic active zone proteins in Huntington's disease*. Acta Neuropathol Commun, 2020. **8**(1): p. 77.
106. Regus-Leidig, H., S. tom Dieck, and J.H. Brandstatter, *Absence of functional active zone protein Bassoon affects assembly and transport of ribbon precursors during early steps of photoreceptor synaptogenesis*. Eur J Cell Biol, 2010. **89**(6): p. 468-75.
107. Michelassi, F., et al., *A C1-C2 Module in Munc13 Inhibits Calcium-Dependent Neurotransmitter Release*. Neuron, 2017. **95**(3): p. 577-590 e5.
108. Ghiglieri, V., et al., *Epilepsy-induced abnormal striatal plasticity in Bassoon mutant mice*. Eur J Neurosci, 2009. **29**(10): p. 1979-93.
109. Weidenhofer, J., R.J. Scott, and P.A. Tooney, *Investigation of the expression of genes affecting cytomatrix active zone function in the amygdala in schizophrenia: effects of antipsychotic drugs*. J Psychiatr Res, 2009. **43**(3): p. 282-90.
110. Fu, P., et al., *Abnormal Expression of FBXL20 in Refractory Epilepsy Patients and a Pilocarpine-Induced Rat Model*. Neurochem Res, 2016. **41**(11): p. 3020-3031.
111. Maningat, A.L. and S. Munakomi, *Neuroanatomy. Superior Cervical Ganglion*. StatPearls [Internet], 2019.

112. Daubner, S.C., T. Le, and S. Wang, *Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis*. Arch Biochem Biophys, 2011. **508**(1): p. 1-12.
113. Proctor, G.B. and G.H. Carpenter, *Regulation of salivary gland function by autonomic nerves*. Auton Neurosci, 2007. **133**(1): p. 3-18.
114. Moon, S., et al., *Superior cervical sympathetic ganglion block under ultrasound guidance promotes recovery of abducens nerve palsy caused by microvascular ischemia*. Scand J Pain, 2019. **20**(1): p. 211-214.
115. Cassaglia, P.A., R.I. Griffiths, and A.M. Walker, *Sympathetic nerve activity in the superior cervical ganglia increases in response to imposed increases in arterial pressure*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **294**(4): p. R1255-61.
116. Pearson, J. and B.A. Pytel, *Quantitative studies of sympathetic ganglia and spinal cord intermedio-lateral gray columns in familial dysautonomia*. J Neurol Sci, 1978. **39**(1): p. 47-59.
117. Alshami, A.M., *Prevalence of spinal disorders and their relationships with age and gender*. Saudi medical journal, 2015. **36**(6): p. 725.
118. Teraguchi, M., et al., *Prevalence and distribution of intervertebral disc degeneration over the entire spine in a population-based cohort: the Wakayama Spine Study*. Osteoarthritis and cartilage, 2014. **22**(1): p. 104-110.

6. Prezentacja dorobku dydaktycznego i organizacyjnego oraz osiągnięć w zakresie popularyzacji nauki lub sztuki

Moje zainteresowanie nauczaniem i mentoringiem rozwinęło się w ostatnich latach moich studiów weterynaryjnych i trwa nieprzerwanie od tamtej pory. Począwszy od 2001 roku, kiedy pracowałam jako asystentka na swojej rodzimej uczelni, konsekwentnie rozbudowywałam swoje portfolio dydaktyczne, prowadząc wykłady i ćwiczenia zarówno w Polsce, jak i w USA. Oprócz typowego nauczania akademickiego byłam również mentorem studentów kierunków biologicznych i medycznych, którzy publikowali ze mną i kontynuowali własne projekty badawcze. Obecnie pełnię rolę promotora pomocniczego doktorantki w dziedzinie weterynarii na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie, która ma obronić pracę doktorską w 2022 .

Doświadczenie dydaktyczne w porządku chronologicznym:

- 2001 – 2002 Współprowadzenie ćwiczeń
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn,
Przedmiot: Anatomia Zwierząt
- 2002 - 2007 Samodzielne prowadzenie ćwiczeń w ramach studiów doktoranckich
Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn
Przedmiot: Anatomia Ogólna z Podstawami Histologii (ćwiczenia)
- 2014 – 2015 Wykłady i ćwiczenia (stanowisko: Adjunct Assistant Professor)
Borough of Manhattan Community College, CUNY, Nowy Jork, USA;
Przedmioty: Biologia ogólna, Anatomia i Fizjologia człowieka I i II
- 2014 – 2019 Wykłady i ćwiczenia (stanowisko: Adjunct Assistant Professor)
New York City College of Technology, CUNY, Nowy Jork, USA;
Przedmioty: Anatomia i Fizjologia I i II
- 2016 – 2017 Gościnne wykłady i seminaria
Wydział Lekarski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
Przedmiot: Immunologia dla studentów medycyny (wykłady i seminaria)

Cele nauczania w praktyce - doświadczenie edukacyjne (USA/Polska)

Głównym celem mojego nauczania było i jest pobudzanie moich studentów do krytycznej i wnikliwej oceny rzeczywistości, do odróżniania prawdziwych i fałszywych informacji (true vs fake information) w danej dziedzinie. We wszystkich prowadzonych przeze mnie zajęciach starałam się osiągnąć następujące cele:

1. Zwiększenie podstawowej wiedzy studentów na tematy poruszane na zajęciach.
2. Pomoc studentom w stawaniu się krytycznymi odbiorcami informacji, zdolnymi do podejmowania świadomych decyzji bazujących na rzetelnej, opartej na faktach wiedzy i dobrze ugruntowanych dowodach.
3. Poprawienie umiejętności pisemnej komunikacji studentów poprzez egzekwowanie zadań i przekazywanie informacji zwrotnych.

Oprócz prowadzenia tradycyjnych zajęć w oparciu o materiały podręcznikowe, brałam również udział w inicjatywie OpenLab w New York College of Technology, gdzie zamiast korzystać z kosztownych podręczników, studenci korzystali z darmowych podręczników licencjonowanych przy użyciu Creative Commons (CC), napisanych przez znanych profesorów biologii, anatomii i fizjologii i dostępnych bezpłatnie dla wszystkich studentów szkół wyższych na całym świecie. Podręczniki z których korzystałam to: <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology> i <http://ocr2go.org/mods/en-boundless/www.boundless.com/physiology/index.html>. Większość podręczników jest napisana w języku angielskim i hiszpańskim, ale niektóre z nich zostały przetłumaczone także na inne języki. W Polsce inicjatywa Open Textbook została w pełni zainaugurowana w 2019 roku z założeniem udostępnienia polskim studentom takich bezpłatnych, polskojęzycznych podręczników na licencji CC.

Zadania i zajęcia

W pracy z amerykańskimi studentami college'u, starałam się ocenić skuteczność swojego nauczania na różne sposoby m.in. zadania domowe na ocenę, sprawozdania z wykonanych ćwiczeń laboratoryjnych, ustne egzaminy praktyczne i egzaminy pisemne. Szczegółowa metodologia obejmowała: ćwiczenia praktyczne obejmujące pomiary bezpośrednie i pośrednie, mikroskopię, testy biochemiczne i sekcje zwierząt (wszystkie kursy). Studenci zapoznali się również z teorią metody naukowej, a następnie wykorzystali zdobytą wiedzę w praktyce, pracując w dwu- lub czteroosobowych zespołach nad różnymi doświadczeniami laboratoryjnymi, takimi jak: ocena szybkości fotosyntezy (zajęcia z biologii), neurologiczne badanie odruchów, badania morfologiczne i biochemiczne krwi (zajęcia z anatomii i fizjologii), dokonywanie obserwacji naukowych, zbieranie danych i wspólna analiza wyników. Studenci byli również aktywnie oceniani na podstawie ich zaangażowania w dyskusje na zajęciach na temat różnych bieżących kwestii związanych z tematem zajęć, kiedy to możliwe; na przykład gazy cieplarniane i zmiany klimatyczne w świetle konferencji klimatycznej w Paryżu (zajęcia z biologii); alergię pokarmową - dlaczego wrażliwość na gluten rośnie w zachodnim świecie; czym jest ruch antyszczepionkowy itp.

Oprócz zaplanowanych zadań i zajęć w sali ćwiczeniowej bądź wykładowej, starałam się również zapewnić szereg dodatkowych opcji zaliczeniowych, aby studenci, którzy byli zainteresowani poszerzeniem swojej wiedzy poza tematami poruszonymi na zajęciach i/lub poprawieniem swoich ocen, mogli to zrobić w wolnym czasie. Podczas mojej pracy dydaktycznej zauważyłam, że dodatkowe zaliczenia są najlepszym sposobem na zmotywowanie studentów do zgłębiania i samodzielnego poszukiwania informacji na dany temat. W ciągu ostatnich kilku semestrów otrzymałam wiele wysokiej jakości esejów i prezentacji. Zauważyłam, że zadaniem, które najbardziej pobudza kreatywność studentów, było napisanie rozdziału „wymyślanego”

podręcznika laboratoryjnego na temat rozmnażania roślin i zwierząt. Otrzymałam wiele dobrze napisanych, obszernie zilustrowanych i bardzo pouczających rozdziałów na ten temat, a wiele z nich z przyjemnością przedstawiłabym szerszej publiczności, gdyby było to możliwe.

Wzbogacanie nauczania (USA)

Na podstawie informacji zwrotnych otrzymanych od moich studentów i wykładowców obstruwających moje zajęcia, wprowadziłam pewne poprawki do mojego stylu nauczania. Oto one:

1. Zwiększona praca zespołowa: przydzielenie konkretnego problemu małej grupie uczniów i umożliwienie im znalezienia rozwiązania. Nie było dobrych ani złych odpowiedzi, jedynie tylko opcje do dyskusji.
2. Jeopardy: jako dodatkowy element obok standardowego przeglądu materiału przed każdym testem, wprowadziłam gry Jeopardy na moich zajęciach z anatomii i fizjologii. W ramach gry studenci zostali podzieleni na zespoły, w każdym zespole omawiają swoje pomysły i wspólnie pracują nad odpowiedzią na zadane pytanie. W zależności od trudności pytania zespoły mieli od 60 do 90 sekund na znalezienie odpowiedzi. Zespół z najwyższym wynikiem otrzymywał punkty, które później brane były pod uwagę przy wystawianiu oceny końcowej z przedmiotu. Gra stała się bardzo popularna, a frekwencja sięgnęła od 95 do 98% wszystkich biorących w zajęciach studentów.
3. Quizy online: oprócz prezentacji za pośrednictwem poczty elektronicznej i/lub popularnej platformy edukacyjnej Blackboard, powszechnie używanej na amerykańskich uczelniach, udostępniałam również linki do dodatkowych materiałów przeglądowych online i quizów do samooceny.

Osiągnięcia organizacyjne

Moim największym osiągnięciem naukowym o wymiarze praktycznym jest uzyskanie 5-cio letniego grantu SONATA BIS nr 2018/30/E/NZ5/00458, dzięki któremu możliwe stało utworzenie od podstaw i kierowanie własnym zespołem naukowym w Centrum Medycyny Eksperymentalnej, na Wydziale Lekarskim, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Celem badawczym grantu jest określenie roli sygnalizacji Diaph1 w patogenezie neuropatii cukrzycowej.

Uzyskanie grantu SONATA BIS stanowiło zwieńczenie moich wieloletnich badań i wyznacza kierunek dalszego rozwoju badawczego. Oprócz uzyskania grantu, przez lata, dzięki pracy w wielu ośrodkach naukowych w Polsce i zagranicą udało mi się również stworzyć ramy naukowej współpracy międzynarodowej. Oprócz tego działałam również aktywnie na rzecz społeczności naukowej, recenzując dla wielu czasopism naukowych – pełna lista w wykazie dorobku naukowego.

Weześniej, w latach 2011-2013 byłam współodpowiedzialna za działalność pracowni mikroskopii świetlnej i fluorescencyjnej w laboratorium prof. Ann Marie Schmidt, Diabetes Research Center, New York University Medical Center, NY, USA.

Zwyciężeniem moich starań naukowych i organizacyjnych było przyznanie Polskiej Nagrody Inteligentnego Rozwoju przez Centrum Innowacyjnego Rozwoju. Krótki wywiad poniżej.

<https://rzecz.pl/blog/2021/01/18/neuropatia-cukrzycowa-jest-to-choroba-nerwow-obwodowych-wywolanych-dlugotrwała-cukrzyca-i-stale-podwyższonym-poziomem-cukru-we-krwi/>

7. Pozostałe informacje

Oprócz pracy naukowej, miałam również okazję brać udział w programie mającym na celu ułatwienie współpracy między naukowcami i przedsiębiorcami w celu komercjalizacji odkryć naukowych. Program o nazwie I-CORPS https://www.nsf.gov/news/special_reports/i-corps/, zainicjowany przez National Science Foundation (Alexandria, VA, USA) w celu wspierania partnerstwa między środowiskami akademickimi i biznesowymi, dostarczał różne narzędzia torujące drogę do przekuwania pomysłów badawczych w praktyczne, mające zastosowania w przemyśle czy służbie zdrowia.

Wraz z moim kolegą, dr Venkateshem Ramakrishnanem, prowadząc wówczas badania w City University of New York (CUNY) Graduate Center, napisaliśmy krótką propozycję wykorzystania technologii czipów mikroprzepływowych do wczesnego wykrywania obwodowej neuropatii cukrzycowej u pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 1 i 2. Proponowana przez nas technologia wyróżniała się na tle innych, ponieważ była mało inwazyjna i niedroga w porównaniu do obecnie stosowanych we wczesnej diagnostyce neuropatii badań elektrofizjologicznych czy biopsji skóry. Zastosowanie technologii mikroczipów pozwoliłoby na wczesne zidentyfikowanie białek markerowych zaangażowanych w patogenezę neuropatii i dostarczyłoby informacji o prawdopodobieństwie rozwoju choroby przy użyciu próbek krwi pacjentów ze zdiagnozowaną cukrzycą typu 1 i 2 na urządzeniach mikroprzepływowych. Krótkie wprowadzenie do projektu znajduje się w podanym odnośniku <https://tinyurl.com/y44hzkhk>. Stosując urządzenia mikroprzepływowe, byłibyśmy w stanie zapewnić w pełni dokładny i czuły odczyt przy minimalnej wielkości pobieranych próbek, dzięki czemu zwiększyłby się komfort pacjentów skierowanych na testy z podejrzeniem DPN, jednocześnie zmniejszając koszty i wysiłek personelu medycznego. Szybkość i dokładność proponowanych testów umożliwiłaby nam uzyskanie w bardzo krótkim czasie informacji zwrotnej o stanie nerwów obwodowych u pacjentów z cukrzycą, umożliwiając i identyfikując potrzebę podjęcia proaktywnych środków zapobiegawczych przed rozwojem choroby u pacjentów wysokiego ryzyka.

Ze względu na ograniczenia czasowe programu oraz niewielki zasób danych do dyspozycji środków finansowych, nie udało nam się oddać do użytku przygotowanego prototypu urządzenia, jednak dzięki uczestnictwu w programie poznaliśmy know-how komercjalizacji projektów naukowych takich jak regulacje dotyczące zagadnień własności intelektualnej (IP, intellectual property), sposoby uzyskiwania patentów zarówno na rynku unijnym jak i amerykańskim, zasady udzielania licencji, a także złożyliśmy aplikację patentową na proponowane przez nas urządzenie, uzyskując ważny przez rok status: patent pending. Mieliśmy również okazję spotkać się z tzw. angel investors, filantropami z kręgu biznesu, którzy swoimi środkami finansowymi oraz zasobami ludzkimi wspierają młode talenty badawcze, umożliwiając współpracę między nauką a przemysłem.

9.03.2021



**Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych,
stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej
dyscypliny**

dr n. wet. Judyta Karolina Juranek

**Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka
Wydział Lekarski, Collegium Medicum
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie**

I. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH NAUKOWYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWYTytuł osiągnięcia naukowego:

Rola Receptora Końcowych Produktów Zaawansowanej Glikacji (RAGE – Receptor for Advanced Glycation End-products) w patogenezie chorób neurozwyrodnieniowych

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia:

1. **JK Juranek**, A Aleshin, EM Rattigan, I. Johnson, W Qu, F Song, R Ananthakrishnan, N Quadri, SD Yan, R Ramasamy, AM Schmidt, MS Geddis (2010) *Morphological Changes and Immunohistochemical Expression of RAGE and its Ligands in the Sciatic Nerve of Hyperglycemic Pig (Sus Scrofa)*. *Biochem Insights*. 3:47-59.

IF – nie określony w czasie opublikowania pracy, pkt. MNiSW: przed 2018 – 2, po 2018 – 20

Większość etapów tworzenia publikacji zostało wykonanych przeze mnie: projekt doświadczenia, przeprowadzenie badań - barwienie immunofluorescencyjne, analiza mikroskopowa i statystyczna, jakościowa i ilościowa ocena występowania badanych substancji oraz ich kolokalizacja; przygotowanie zdjęć oraz tekstu manuskryptu. Współautorzy: AA, EMR, LJ byli zaangażowani w nadzór oraz pobranie próbek od zwierząt; WQ, FS przygotowali przeciwciała skierowane przeciwko RAGE; RA, NQ, SDY, RR pomogli w analizie hematologicznej i przygotowaniu ELISA, AMS i MSG wykonali korektę ostatecznej wersji publikacji.

2. **JK Juranek**, MS Geddis, F Song, J. Zhang, J Garcia, R Rosario, SF Yan, TH Brannagan, AM Schmidt (2013) RAGE deficiency improves post-injury sciatic nerve regeneration in type 1 diabetic mice. *Diabetes* 62(3):931-943

IF - 8.474, pkt. MNiSW: przed 2018 – 45, po 2018 – 140

Większość etapów powstawania tej publikacji zostało wykonane przeze mnie w ciągu 5 lat pracy na stażu doktorskim. Byłam szeroko zaangażowana w opiekę i monitorowanie stanu zwierząt, wywoływanie cukrzycy przez dootrzewnowe wstrzyknięcia streptozotocyny, wykonywanie zabiegów mikrochirurgicznych na nerwie kulszowym, testy elektrofizjologiczne tj. badanie szybkości przewodzenia nerwów, asystowanie przy zabiegach przeszczepiania szpiku kostnego; wykonałam również większość eksperymentów tj. analizę morfometryczną regeneracji / utraty aksonów, barwienie histochemiczne i immunofluorescencyjne w celu oceny stopnia degeneracji nerwów oraz analizę kolokalizacji RAGE i jego prozapalnych ligandów, analizę mikroskopową, ocenę ilościową liczby makrofagów w miejscu urazu oraz przygotowanie, hodowanie i ocena żywotności pierwotnych kultur makrofagów w pożywkach o wysokiej i niskiej zawartości glukozy w obecności prozapalnych i prooksydacyjnych czynników stresowych. Przygotowałam również wszystkie zdjęcia oraz tekst manuskryptu. Współautorzy: MSG wykonał badania pilotażowe skuteczności farmakologicznej indukcji hiperglikemii u myszy, FS wykonała zabieg przeszczepu szpiku kostnego, JZ przeprowadził wstępną ocenę ilościową liczby makrofagów w miejscu uszkodzenia nerwu kulszowego, JG sprawował nadzór techniczny w czasie przeprowadzania testów elektrofizjologicznych, RR sprawowała nadzór techniczny nad zwierzętami, SFY zaprojektowała startery do RT-PCR, THB pomógł we wstępnej ocenie wyników testów elektrofizjologicznych, AMS sprawowała całościowy nadzór nad projektem oraz wykonała korektę ostatecznej wersji publikacji.

3. **JK Juranek**, MS Geddis, R. Rosario, AM Schmidt (2013) Impaired Slow Axonal Transport in Diabetic Peripheral Nerve is Independent of RAGE. *Eur. J. Neurosci.* 38(8):3159-68

IF – 3.67, pkt. MNiSW: przed 2018 – 30, po 2018 – 100

Większość etapów tworzenia publikacji została wykonana przeze mnie: plan doświadczenia, zabiegi podwiązania nerwów kulszowych, barwienie immunofluorescencyjne, analiza mikroskopowa i ocena ilościowa transportu aksonalnego oraz kolokalizacja, analiza statystyczna, przygotowanie rycin oraz tekstu manuskryptu. Współautorzy: MSG przygotował pierwszą grupę zwierząt z indukowaną farmakologicznie cukrzycą, RR sprawowała nadzór techniczny nad zwierzętarnią, a AMS wykonała korektę ostatecznej wersji publikacji.

4. **JK Juranek**, P Kothary, A Mehra, A Hays, TH Brannagan, AM Schmidt (2013). Increased expression of the Receptor for Advanced Glycation End Products in human peripheral neuropathies. *Brain and Behavior* 3(6):701-709

IF – nie określony w czasie publikowania pracy, pkt. MNiSW: przed 2018 – 20, po 2018 – 70

Większość etapów przygotowania publikacji zostało wykonanych przeze mnie: projekt doświadczenia, barwienia immunofluorescencyjne oraz immunoblotting, analiza mikroskopowa, ocena ilościowa i jakościowa danych oraz analiza statystyczna, przygotowanie rycin oraz tekstu manuskryptu. Współautorzy: PK i AM wykonali pilotażowe barwienia immunofluorescencyjne oraz immunoblotting, AH i TH dostarczyli wycinki nerwów obwodowych od pacjentów z rozpoznaną cukrzycą leczonych w szpitalu Uniwersytetu Columbia, a AMS wykonała korektę ostatecznej wersji publikacji.

5. M Manigrasso, **JK Juranek**, R Ravichandran, AM Schmidt (2014) Unlocking the Biology of RAGE in Diabetic Microvascular Complications - One Ligand at a Time. *Trends Endocrinol Metab* 25(1):15-22

IF – 9.39, pkt. MNiSW: przed 2018 – 45, po 2018 – 200

Niniejsza publikacja stanowiła uwieńczenie badań nad rolą RAGE w powikłaniach cukrzycy. Na potrzeby niniejszej publikacji przygotowałam wszystkie ryciny i ich opisy, napisałam rozdział dotyczący neurologicznych powikłań cukrzycy oraz współredagowałam ostateczną wersję manuskryptu. Współautorzy: MM napisała rozdział poświęcony nefrologicznym powikłaniom cukrzycy i pomogła w przygotowaniu ostatecznej wersji artykułu, RR i AMS przygotowali pozostałe części manuskryptu i zredagowali ostateczną wersję publikacji.

6. **JK Juranek**, GK Daffu, J Wojtkiewicz, D Lacomis, J Kofler, AM Schmidt (2015) Receptor for Advanced Glycation End Products and its Inflammatory Ligands are Upregulated in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 22;9:485

IF – 4.6, pkt. MNiSW: przed 2018 – 35, po 2018 – 100

Większość etapów przygotowania publikacji zostało wykonanych przeze mnie: współtworzyłam projekt oraz plan doświadczeń, pozyskałam próbki materiału do badań, wykonałam immunobarwienia oraz przeprowadziłam ocenę ilościową barwienia, analizę statystyczną, przygotowałam ryciny oraz tekst manuskryptu. Współautorzy: GDK brała udział w wykonaniu RT-PCR oraz współredagowała ostateczną wersję manuskryptu, JW, DL, JK brali współudział w pozyskiwaniu materiału do badań, AMS zredagowała ostateczną wersję manuskryptu.

7. **JK Juranek**, GK Daffu, MS Geddis, K Li, R Rosario, BJ Kaplan, L Kelly, AM Schmidt (2016) Soluble RAGE Treatment Delays Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in SOD1 Mice. *Front Cell Neurosci.* 9;10:117

IF – 4.55, pkt. MNiSW: przed 2018 – 35, po 2018 – 100

Na potrzeby niniejszej publikacji, przez okres dwóch lat opiekowałam się, monitorowałam stan zdrowia oraz przygotowywałam do badań ruchowych myszy transgeniczne G93A SOD1; przeprowadzałam testy funkcji motorycznych oraz podawałam myszom substancję leczniczą bądź placebo (dostrzewnowo, codziennie) począwszy od wieku 60 dni do humanitarnego punktu końcowego (od 138 do 163 dnia życia), oceniałam krzywą przeżywalności, skuteczność badanej substancji leczniczej, przeprowadziłam analizę statystyczną, wykonałam barwienie histochemiczne (DAB, fiolekt krezyłu) oraz analizę mikroskopową, przygotowałam ryciny oraz tekst manuskryptu. Współautorzy: GDK brała udział w wykonaniu RT-PCR oraz współredagowała ostateczną wersję manuskryptu, MSG wykonał badania pilotażowe stanu zdrowia oraz postępu choroby myszy G93A SOD, RR sprawowała nadzór techniczny nad zwierzętarnią, BJK i LK asystowali w genotypowaniu oraz przeprowadzili pilotażowe testy motoryczne, AMS dokonała korekty ostatecznej wersji manuskryptu.

8. R Ray, **JK Juranek***, V Rai (2016) RAGE axis in neuroinflammation, neurodegeneration and its emerging role in the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev.* 62:48-55

* wspólne pierwsze autorstwo

IF – 8.29, pkt. MNiSW: przed 2018 – 45, po 2018 – 200

Niniejsza publikacja stanowi podsumowanie aktualnej wiedzy dotyczącej roli RAGE w stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis) bazujące m.in. na wynikach moich wcześniejszych badań. Byłam współautorką pomysłu publikacji, przygotowałam jej zarys oraz wszystkie ryciny, opracowałam bibliografię oraz przeprowadziłam korektę ostatecznej wersji manuskryptu. Współautorzy: RR przygotowała szkic publikacji, VR był współautorem pomysłu publikacji oraz brał udział w korektach w procesie przygotowywania publikacji.

Dane Infometryczne dotyczące osiągnięcia

Łączna punktacja wszystkich przedstawionych artykułów naukowych wchodzących w skład jednotematycznego cyklu opublikowanego w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR) wynosi:

- według wykazu listy czasopism punktowanych MNiSW
237 pkt wg. punktacji obowiązującej do końca 2018,
930 pkt wg. punktacji obowiązującej po wprowadzeniu nowej ustawy o Szkolnictwie Wyższym opublikowanym obowiązującym od początku roku 2019
- łączny współczynnik oddziaływania, impact factor (IF) według daty publikacji:
38.99
- łączna liczba cytowań według bazy Web of Science wynosi: 296, bez autocytaowań – 284
- średnia liczba cytowań na publikację: 37

II. INFORMACJA O AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ

Przed uzyskaniem stopnia doktora

Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych

1. J. Kaleczyc, **J. Juranek**, J. Calka, M. Lakomy (2005) *Immunohistochemical characterization of neurons in porcine ciliary ganglion*. *Pol. J. Vet. Sci.* 8(1): 65-72.

IF – nie określony w czasie opublikowania pracy, pkt. MNiSW: przed 2018 – 4, po 2018 – 40

Na potrzeby niniejszej publikacji sprawowałam opiekę zootechniczną i weterynaryjną nad zwierzętami doświadczalnymi, pobierałam materiał do badań oraz przeprowadziłam eksperymenty tj. barwienie immunofluorescencyjne wraz z późniejszą analizę mikroskopową, ilościową i jakościową, przygotowałam ryciny oraz tekst publikacji. Współautorzy: JK opracował plan badań, a JC i ML nadzorowali przebieg badań i przygotowali ostateczną korektę manuskryptu.

2. M. Wisniewska, J. Madany, A. Pomianowski, **J. Juranek** (2005) *Obesity in carnivores*. *Pol. J. Vet. Sci.* 8(4): 329-335.

IF – nie określony w czasie opublikowania pracy, pkt. MNiSW: przed 2018 – 6, po 2018 – 40

Na potrzeby niniejszej publikacji wykonałam przegląd oraz ostateczny wybór piśmiennictwa, przygotowałam wstępną wersję publikacji oraz dokonałam ostatecznej korekty tekstu. Współautorzy: MW przygotowała szkic artykułu, JM i AP wykonali korekty edytorskie w procesie powstawania publikacji.

3. **J. Juranek**, K. Mukherjee, M. Rickmann, H. Martens, J. Calka, T. Sudhof, R. Jahn (2006). *Differential expression of active zone proteins in neuromuscular junctions suggests functional diversification*. *Eur. J. Neurosci.* 24(11): 3043-3052.

IF – 3,70 pkt. MNiSW: przed 2018 – 24, po 2018 – 100

Mój wkład w niniejszą publikację polegał na współpracowaniu zarysu projektu, monitorowaniu hodowli zwierząt laboratoryjnych, pobranie i przygotowanie próbek do badań, wykonanie barwień immunofluorescencyjnych, analiza mikroskopowa, ilościowa oraz statystyczna; przygotowałam ryciny oraz napisałam tekst manuskryptu. Współautorzy: KM współtworzył zarys projektu oraz wykonał immunoblotting, HM dostarczył przeciwciała do barwień immunofluorescencyjnych, JC służył pomocą we wstępnej analizie mikroskopowej, TS i RJ nadzorowali przebieg badania i wykonali korektę ostatecznej wersji publikacji.

4. J. Calka, **J. Juranek**, K. Wasowicz, J. Kaleczyc, M. Lakomy (2007) *Distribution and morphology of ChAT- and VAcHT immunoreactive neurons in the tuberal hypothalamus of the pig*. *Med. Wet.* 63(4): 412-415.

IF – 0.28 pkt. MNiSW: przed 2018 – 10, po 2018 – 20

Na potrzeby niniejszej publikacji wykonałam przegląd oraz wybór piśmiennictwa, opracowałam ryciny oraz wykonałam korekty edytorskie i językowe manuskryptu. Współautorzy: JC przygotował plan badawczy, pobrał próbki i napisał tekst manuskryptu, KW pomagał w opiece nad zwierzętami oraz asystował przy pobieraniu materiału do badań, JK brał udział w redakcji tekstu, a ML nadzorował przebieg badań.

Publikacje punktowane przez MNiSW, ale nie dostępne w bazie Journal Citation Reports

1. JK Juranek, B Buzon, M Jedlińska-Krakowska, J Całka (2006) *Rozpoznanie i leczenie zaburzeń cyklu płciowego oraz ciąży u szczurów laboratoryjnych*. **Mag. Wet.** 5: 63-65

IF – nie dotyczy, MNiSW: przed 2018 – 3, po 2018 – wykreślone z listy

Na potrzeby niniejszej publikacji napisałam tekst manuskryptu, wykonałam zdjęcia i przygotowałam ryciny, asystowałam przy wykonaniu zabiegów oraz analizie danych. BB sprawowała nadzór nad zwierzętami oraz pobierała materiał do analizy, MJ-K pomogła w analizie danych, JC przygotował korektę ostatecznej wersji publikacji.

2. JK Juranek, J Całka, M Łakomy (2007) *Białka synaptycznej strefy aktywnej - koordynatory procesu neurotransmisji w układzie nerwowym*. **Humanistyka i Przyrodoznawstwo** 13: 273 – 280

IF – nie dotyczy, MNiSW: przed 2018 – 2, po 2018 – 20

Większość etapów tworzenia tej publikacji zostało wykonanych przeze mnie; napisałam tekst manuskryptu, przygotowałam ryciny oraz piśmiennictwo. Współautorzy: JC i MŁ wykonali korektę edytorską i przygotowali wersję ostateczną artykułu do druku

Udział w konferencjach krajowych i zagranicznych

1. Zjazd Studenckich Anatomicznych Kół Naukowych, Poznań (1999) – referat
- **J Juranek**, A Kania, A Piastowska: *Rozmieszczenie i charakterystyka immunohistochemiczna neuronów zaopatrujących dodatkowe gruczoły płciowe u świni domowej*

2. Zjazd Studenckich Anatomicznych Kół Naukowych, Wrocław (2000) – referat, wyróżnienie
- **J Juranek**: *Zwój rzęskowy – charakterystyka morfologiczna i immunohistochemiczna*

3. Zjazd Polskiego Towarzystwa Weterynaryjnego, Oddział w Olsztynie (2004) – referat
- **J Juranek**, K Mukherjee, M Rickmann, R Jahn: *Rozmieszczenie białek synaptycznej strefy aktywnej w rdzeni kręgowym oraz synapsach obwodowych u szczura*

4. XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Kielce (2005) - referat
- **J Juranek**, K Mukherjee, M Rickmann, R Jahn: *Molekularne uwarunkowania powstawania presynaptycznych połączeń w płytkach nerwowo-mięśniowych*

5. VII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego, Kraków (2005) – poster
- **J Juranek**, K Mukherjee, M Rickmann, R Jahn: *Molecular determinants of presynaptic specialization of two structurally and functionally divergent neuromuscular junctions*

6. XLI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Stare Jabłonki (2006) referat
- **J Juranek**, JY Li, R Jahn, J Całka: *Transport białek synaptycznej strefy aktywnej w obwodowym układzie nerwowym szczura*

7. XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Anatomicznego oraz XLII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Poznań (2007) – poster
- **J Juranek**, J Całka, K Mukherjee, G AH, JY L.: *Expression of Active Zone proteins in the developing rat cerebellar cortex*

Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora**Rozdział w monografii naukowej**

J Juranek, K Mukherjee (2009) *Piccolo and Bassoon. Encyclopedia of Neuroscience*, Elsevier, p. 707-711

Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z pominięciem publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, wykazanych w części I załącznika)

1. I Brunk, C Blex, C Sanchis-Segura, J Sternberg, S Perreau-Lenz, A Bilbao, H. Hörtnagl, J Baron, **J Juranek**, G Laube, L Birnbaumer, R Spanagel, G Ahnert-Hilger (2008) *Deletion of Go2a abolishes cocaine-induced behavioral sensitization by disturbing the striatal dopamine system. The FASEB Journal* 22: 3736-3746

IF – 7.049 pkt. MNiSW: przed 2018 – 24, po 2018 – 140

Mój wkład do niniejszego artykułu polegał na obróbce tkanki, wykonaniu barwień immunofluorescencyjnych, analizie mikroskopowej oraz przygotowaniu zdjęć do publikacji. Współautorzy: IB i CB – wykonali większość zaprezentowanych w publikacji badań, CS-S asystowała w testach farmakologicznych, JS brał udział w pozyskiwaniu i obróbce materiału, SP-L, AB, III sprawowali nadzór techniczny nad badaniami z udziałem użytych substancji psychoaktywnych, JB asystował w procesie oczyszczania białek przy pomocy chromatografii ciekłej (HPLC), GL, LB, RS, GA-H sprawowali całościowy nadzór nad projektem i przygotowali ostateczną wersję publikacji

2. J Wojtkiewicz, **JK Juranek***, I Kowalski, M Bładowski, J Całka, M Majewski (2011) *Immunohistochemical characterization of superior cervical ganglion neurons supplying porcine parotid salivary gland. Neurosci Lett.* 500 (1): 57-62.

IF 2.105 pkt. MNiSW: przed 2018 – 20, po 2018 – 70

* wspólne pierwsze autorstwo

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu piśmiennictwa, analizie danych uzyskanych w trakcie badania, przygotowaniu wstępnej wersji artykułu oraz późniejszych korekt edytorskich. Współautorzy: JW zebrała materiał, wykonała barwienia immunofluorescencyjne oraz późniejszą analizę mikroskopową, IK, MB asystowali w pozyskiwaniu materiału i późniejszej analizie mikroskopowej, JC sprawował nadzór techniczny nad projektem, MM sprawował nadzór merytoryczny nad projektem oraz przygotował korektę ostatecznej wersji publikacji.

3. **JK Juranek**, K Mukherjee, T Siddiqui, B Kaplan, JY Li, G Ahnert-Hilger, R Jahn, J Calka (2013). *Active Zone protein expression changes at key stages of cerebellar cortex neurogenesis in the rat. Acta Histochemica* 115(6):616-625

IF – 1.760 pkt. MNiSW: przed 2018 – 15, po 2018 – 70

Na potrzeby niniejszej publikacji zoptymalizowałam technikę synchronizacji rui u szczurów, sprawowałam nadzór hodowlany i weterynaryjny nad zwierzętami, pobrałam i przygotowałam materiał do badań, wykonałam barwienia immunofluorescencyjne wraz z późniejszą analizą mikroskopową, jakościową, ilościową i statystyczną, przygotowałam ryciny oraz tekst manuskryptu, KM nadzorował hodowlę neuronalną, przygotował materiał zdjęciowy pochodzący z wybarwionych hodowli oraz wykonał badania biochemiczne (immunoblotting),

TS asystował w analizie mikroskopowej uzyskanych wyników oraz pomógł w opracowaniu tekstu, BK brał udział w barwieniach immunofluorescencyjnych, JYL, GA-H i JH sprawowali nadzór techniczny nad wykonaniem projektu, JC sprawował nadzór merytoryczny nad projektem i wprowadził korekty edytorskie manuskryptu

4. **JK Juranek**, MS Geddis, P Kothary, A Hays, AM Schmidt, TH Brannagan (2014) *Expression of Munc13-1 is reduced in human and porcine diabetic peripheral nerve. Acta Histochemica* 116 (1):106 – 11

IF – 1.714 pkt. MNiSW: przed 2018 – 15, po 2018 – 70

Większość etapów powstawania publikacji została wykonana przeze mnie. Wywołałam farmakologicznie cukrzycę i monitorowałam stan zdrowia zwierząt, pobierałam i przygotowałam do badań pobrany materiał, wykonałam większość barwień immunofluorescencyjnych wraz z późniejszą analizą mikroskopową, ilościową i statystyczną, przygotowałam ryciny oraz tekst manuskryptu. Współautorzy: MSG brał udział w optymalizacji procesu farmakologicznego indukowania cukrzycy i wprowadził edytorskie korekty tekstu, PK optymalizował stężenie przeciwciał użytych do barwień, AH dostarczył wycinki nerwów pochodzące od pacjentów leczonych w Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Columbia, AM i TH sprawowali nadzór merytoryczny nad wykonaniem projektu i wykonali korektę ostatecznej wersji publikacji.

5. **JK Juranek**, J Wojtkiewicz (2015). *Origins and neurochemical complexity of preganglionic neurons supplying the superior cervical ganglion in the domestic pig. J Mol Neurosci.* 55(2):297-304.

IF – 2.353 pkt. MNiSW: przed 2018 – 20, po 2018 – 70

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na asystowaniu w obróbce materiału, analizie ilościowej i statystycznej, opracowaniu piśmiennictwa, przygotowaniu tekstu oraz korekcie ostatecznej wersji manuskryptu. JW pobrała materiał, wykonała barwienia immunofluorescencyjne oraz analizę mikroskopową, przygotowała ryciny oraz wprowadziła korekty edytorskie.

6. **JK Juranek**, M Banach (2015) *The role of RAGE in the diabetic neuropathy. Family Medicine and Primary Care Review* 17 (4): 316-318

IF – 0.32 pkt. MNiSW: przed 2018 – 12, po 2018 – 20

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu wstępnej wersji tekstu, przygotowaniu rycin oraz korekcie edytorskiej ostatecznej wersji publikacji. MB opracowała piśmiennictwo i sprawdziła merytorycznie tekst artykułu.

7. M Banach, JK Juranek, J Antczak (2015) Drug induced neuropathies. *Family Medicine & Primary Care Review* 17 (4): 284–288

IF – 0.32 pkt. MNiSW: przed 2018 – 12, po 2018 – 20

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu piśmiennictwa oraz edycji tekstu, MB dostarczyła artykuły, napisała wersję wstępną manuskryptu, JA wprowadził korekty edytorskie oraz sprawdził tekst pod względem merytorycznym.

8. **JK Juranek**, R Ray, M Banach, V Rai (2015) *Receptor for advanced glycation end-products in neurodegenerative diseases. Rev Neurosci.* 1;26(6):691-8.

IF – 3.198 pkt. MNiSW: przed 2018 – 25, po 2018 – 70

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu zarysu tekstu, rycin oraz przeglądzie piśmiennictwa. RR przygotowała rozdziały o chorobie Alzheimera i Stwardnieniu Zanikowym Boczny, MB przygotowała rozdziały o rodzinnej amyloidowej postaci neuropatii oraz neuropatiach obwodowych, VR zainicjował projekt publikacji oraz przygotował korektę ostatecznej wersji artykułu

9. M Banach, **J Juranek**, A Stanisiz (2015) Korrelacje testu porównującego różnice latencji między mięśniem glistowatym a międzykostnym z testami standardowymi stosowanymi w diagnostyce zespołu cieśni nadgarstka. *Przegl Lek.* 72(6):282-5.

IF – 0.19 pkt. MNiSW: przed 2018 – 10, po 2018 – 20

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu analizy statystycznej oraz korekcie edytorskiej ostatecznej wersji tekstu. MB wykonała badania elektrofizjologiczne i napisała wstępną wersję tekstu, AS sprawdziła tekst pod względem merytorycznym i wprowadziła korekty językowe publikacji.

10. M Banach, M Rakowicz, R Rola, J Antczak, **JK Juranek**, W Krys, A Sulck (2017) *Peripheral nerve lesions in patients with myotonic dystrophy types 1 and 2.* *Przegl Lek.* 74 (12), 643-647

IF – 0.14 pkt. MNiSW: przed 2018 – 10, po 2018 – 20

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu analizy statystycznej oraz korekcie edytorskiej ostatecznej wersji tekstu. MB i MR przygotowały pacjentów i wykonały badania elektrofizjologiczne, RR i JA sprawdzili tekst publikacji pod względem merytorycznym, WK i AS sprawowały nadzór merytoryczny nad przebiegiem badań.

11. M Banach, **JK Juranek**, AL Zygulska (2017) *Chemotherapy-induced neuropathies – a growing problem for patients and health care providers.* *Brain Behav.* 26;7(1):e00558.

IF – 2.219 pkt. MNiSW: przed 2018 – 20, po 2018 – 70

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu piśmiennictwa, współtworzeniu tabeli, przygotowaniu wersji ostatecznej publikacji oraz korektach edytorskich. MB napisała wersję wstępną publikacji oraz przygotowała dane do tabeli, ALZ sprawdziła tekst pod względem merytorycznym i wprowadziła korekty edytorskie.

12. M Barczewska, **JK Juranek**, J Wojtkiewicz (2017) *Origins and Neurochemical Characteristics of Porcine Intervertebral Disc Sympathetic Innervation: a Preliminary Report.* *J Mol Neurosci.* 63:50-57

IF – 2.454 pkt. MNiSW: przed 2018 – 20, po 2018 – 70

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu piśmiennictwa, analizie statystycznej i przygotowaniu tabeli oraz korekcie edytorskiej i językowej tekstu. MB wykonała zabiegi chirurgiczne na zwierzętach i brała udział w pobieraniu materiału, JW wykonała barwienia immunofluorescencyjne i późniejszą analizę mikroskopową oraz sprawowała nadzór merytoryczny nad przebiegiem doświadczenia.

13. E Kruminis-Kaszkiel, **JK Juranek**, W Maksymowicz, J Wojtkiewicz (2018). *CRISPR/Cas9 Technology as an Emerging Tool for Targeting Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS).* *Int J Mol Sci.* 19;19(3) pii: E906

IF – 4.183 pkt. MNiSW: przed 2018 – 30, po 2018 – 100

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu zarysu publikacji, opracowaniu piśmiennictwa oraz korekcie językowej i edytorskiej ostatecznej wersji tekstu. EK-K przygotowała wstępną wersję tekstu oraz piśmiennictwa, WM i JW sprawdzili prace pod względem merytorycznym i wprowadzili korekty edytorskie.

14. M MacLean, J Derk, HH Ruiz, **JK Juranek**, R Ramasamy, AM Schmidt (2019) *The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and DIAPH1: Implications for vascular and neuroinflammatory dysfunction in disorders of the central nervous system. Neurochem Int.* 126:154-164

IF – 3.881 pkt. MNiSW: przed 2018 – 25, po 2018 – 100

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu wstępnych wersji rycin oraz sprawdzenia tekstu pod względem merytorycznym. MM napisał wstępną wersję artykułu oraz przygotował ostateczną wersję rycin, JD napisała rozdział o chorobie Alzheimera, HHR pomógł w opracowaniu części dotyczącej bariery krew-mózg, RR pomógł w opracowaniu rozdziału o chorobach naczyniowych mózgu, AMS przygotowała ostateczną wersję publikacji.

15. N Nowicka, J Juranek, **JK Juranek**, J Wojtkiewicz (2019). *Risk Factors and Emerging Therapies in Amyotrophic Lateral Sclerosis. Int J Mol Sci.* 28;20(11)

IF – 4.556 pkt. MNiSW: przed 2018 – 25, po 2018 – 100

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu piśmiennictwa, korektach edytorskich i merytorycznych oraz przygotowaniu ostatecznej wersji publikacji. Współautorzy: NN i JJ wspólnie napisali wstępną wersję publikacji oraz przygotowali ryciny, JW nadzorowała przebieg projektu.

16. M Zalecki, **J Juranek**, Z Pidsudko, M Mogielnicka-Brzozowska, J Kaleczyc, A Franke-Radowiecka (2020) *Inferior vagal ganglion galaninergic response to gastric ulcers. PLoS One.* 23;15(11):e0242746

IF – 2.740 pkt. MNiSW: przed 2018 – 40, po 2018 – 100

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na przeglądzie piśmiennictwa, opracowaniu tekstu oraz korektach edytorskich i merytorycznych. Współautorzy: MZ napisał wstępną wersję publikacji, wykonał barwienia immunofluorescencyjne oraz zrobił analizę mikroskopową i przygotował zdjęcia, ZP, MM-B i AF-R asystowali przy pobieraniu oraz przygotowaniu materiału do badań, JK nadzorował przebieg projektu.

Pozostałe publikacje, niedostępne w bazie Journal Citation Reports

1. **J Juranek**, J Garcia (2009) *Diagnostyka cukrzycy - od laboratorium do gabinetu lekarskiego. Mag. Wet.* 3 (143): 206-08

IF – nie dotyczy, MNiSW: w 2009 – 2, po 2018 – wykreślone z listy

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu testów elektrofizjologicznych, przygotowaniu tekstu, piśmiennictwa oraz zdjęć. JG przygotowywał zwierzęta do badań i sprawował nadzór techniczny podczas testów elektrofizjologicznych.

2. **JK Juranek** (2011) *Rozpoznawanie chorób neurologicznych na podstawie testów ruchowych-od laboratorium do kliniki. Mag. Wet 11* (196): 1078 – 82

IF – nie dotyczy, MNiSW: w 2011 – 2, po 2018 – wykreślone z listy

Wszystkie etapy powstawania publikacji zostały wykonane przeze mnie; przedstawione doświadczenia wraz z ich opisem, przygotowanie tekstu, zdjęć oraz opracowanie piśmiennictwa.

3. **JK Juranek** (2013) *Neurologiczne powikłania cukrzycy u psów i kotów. Mag. Wet 11* (196): 1078 – 82

IF – nie dotyczy, MNiSW: w 2013 – 3, po 2018 – wykreślone z listy

Wszystkie etapy powstawania publikacji zostały wykonane przeze mnie; przedstawione doświadczenia wraz z ich opisem, przygotowanie tekstu, zdjęć oraz opracowanie piśmiennictwa.

4. **JK Juranek** (2018) *Cukrzyca u psów i kotów – rodzaje insuliny. Mag. Wet 23*(205): 750 - 753

IF – nie dotyczy, MNiSW: w 2018 – 3, po 2018 – wykreślone z listy

Wszystkie etapy powstawania publikacji zostały wykonane przeze mnie; przedstawione doświadczenia wraz z ich opisem, przygotowanie tekstu, zdjęć oraz opracowanie piśmiennictwa.

5. J Derk, M MacLean, **JK Juranek**, AM Schmidt (2018) *The Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) and Mediation of Inflammatory Neurodegeneration. J Alzheimers Dis Parkinsonism.* 8(1). pii: 421

IF – nie określony w czasie ukazania się pracy, pkt. MNiSW: przed 2018 – 1, po 2018 – wykreślona z listy

Mój wkład do tej publikacji polegał na przygotowaniu rycin oraz korekcie edytorskiej tekstu. Współautorzy JD i MM wspólnie napisali tekst publikacji oraz opracowali piśmiennictwo, AMS sprawdziła pracę pod względem merytorycznym i przygotowała korektę ostatecznej wersji artykułu.

Udział w konferencjach krajowych i zagranicznych

1. **38th Meeting of Society of Neuroscience, Washington, USA (2008) – poster**
- **JK Juranek**, A Aleshin, E Rattigan, L Johnson, W Qu, SD Yan, AM Schmidt and MS Geddis
Modeling type 1 diabetes induced peripheral nerve changes in the domestic pig (sus scrofa)

2. **IX Zjazd Polskiego Towarzystwa Neurofizjologii Klinicznej, Kraków (2010) – referat**
- J Juranek, M Geddis, R Rosario, J Garcia, L Weimar, A Polreis, AM Schmidt
Deficyt RAGE wpływa na poprawę regeneracji nerwu kulszowego u myszy z cukrzycą

3. **40th Meeting of Society of Neuroscience, San Diego, USA (2010) – referat i poster**
- J Juranek, T Brannagan, N Reiniger, L Johnson, E Rattigan, R Rosario, AM Schmidt, MS Geddis: *Deleterious effect of hyperglycemia on Munc13-1 expression in the diabetic peripheral nerve* (referat)

- J Juranek, MS Geddis, R Rosario, J Garcia, L Weimar, T Brannagan, A Pollreisz, B Cheng, AM Schmidt: *Deficiency of RAGE improves sciatic nerve regeneration in diabetic mice* (poster)

4. Spotkanie Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Oddział w Olsztynie (2011) - referat

- J Juranek, MS Geddis, R Rosario, J Garcia, L Weimar, T Brannagan, A Pollreisz, B Cheng, AM Schmidt: *RAGE i jego role w regeneracji nerwowej u myszy z cukrzycą indukowaną STZ*

5. NYU Langone Medical Center, Department of Medicine Research Day, Nowy Jork (2011) - poster

- J Juranek, MS Geddis, R Rosario, J Garcia, L Weimar, T Brannagan, A Pollreisz, AM Schmidt: *RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products) and its role in pathogenesis of neuropathy in mouse model of diabetes*

6. 72nd Meeting of American Diabetes Association, Philadelphia, PA, USA (2012) – poster z prezentacją

- J Juranek, MS Geddis, F Song, Y Shan, J Garcia, X Sheng, B Cheng, A Pollreisz, P Kothary, R Rosario, L. Weimar, TH Brannagan, AM Schmidt: *RAGE deficiency improves post-injury sciatic nerve regeneration in type 1 diabetic mice*

7. FENS Featured Regional Meeting, Praga, Czechy (2013) – poster

- J Juranek, M Geddis, R Rosario, B Kaplan, L Kelly, YS Zou, AM Schmidt: *RAGE blockade delays the onset and progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in SOD1 mice*

8. NYU Langone Medical Center, Department of Medicine Research Day, Nowy Jork (2013) - wyróżniony referat

- J Juranek, M Geddis, R Rosario, B Kaplan, L Kelly, YS Zou, AM Schmidt: *RAGE blockade delays the onset and progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis in SOD1 mice*

9. Seminarium, Wydział Nauk Medycznych, UWM, Olsztyn (2014) – referat

- J Juranek, M Geddis, R Rosario, B Kaplan, L Kelly, YS Zou, AM Schmidt: *Rola białka RAGE w patogenezie Stwardnienia Zanikowego Bocznego*

10. X Zjazd Polskiego Towarzystwa Neurofizjologii Klinicznej, Kraków (2015) – poster

- J Juranek, M Banach: *The role of RAGE in the diabetic neuropathy*

11. NYU Langone Medical Center, Department of Neurology Research Day (2017) – poster

- J Juranek, V Rai, G Daffa, M Geddis, T Brannagan, AM Schmidt: *The role of RAGE in neurodegeneration*

12. Drug Discovery & Therapy World Congress and Global Biotechnology Congress, Boston, USA (2017) – poster; J Juranek, J Czarzasta, M Barczewska, T Siwek, W Maksymowicz, J Wojtkiewicz: *Cytokine and chemokine profiles in ALS patients undergoing stem cell experimental treatment*

13. International Conference on Neurology and Brain Disorders, Valencia, Hiszpania (2017) – poster; J Czarzasta, JK Juranek, T Siwek, M Barczewska, W Maksymowicz, J Wojtkiewicz: *Identification of cytokines/chemokines in the blood serum and cerebrospinal fluids after transplantation of bone marrow MSCs to ALS patients*

14. **2nd International Conference on Spine and Spinal Disorders i 6th International Conference on Neurology and Neuromuscular Diseases, Rzym, Włochy (2017) – poster**
- M Dziekoński, JK Juranek, K Jezierska-Woźniak, M Barczewska, T Siwek, S Maksymowicz, M Józwik, M Świderek Matysiak, W Maksymowicz, J Wojtkiewicz:

The level of receptor for advanced glycation end products in the serum of amyotrophic lateral sclerosis patients undergoing stem cell experimental treatment - preliminary study

15. **NEURONUS 2020, IBRO Neuroscience Forum, Kraków (2020) – flashtalk/poster**
- J Juranek, K Mukherjee, R Jahn, JY Li: *Coordinated bi-directional trafficking of synaptic vesicle and active zone proteins in peripheral nerves*

Informacja o uczestnictwie w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

2008 – 2013

Projekt: *RAGE and Nerve Injury, Regeneration, Diabetes and Aging*

Nr. Grantu: 5P01AG017490/0002, National Institute of Aging

Kierownik (Principal Investigator) – Prof. Ann Marie Schmidt, Columbia University and New York Schools of Medicine

Rola: główny wykonawca (postdoctoral fellow)

2017

Projekt: *Targeting the ApoE/A-beta interactions as a therapeutic approach for AD*

Nr. Grantu: 5R01AG031221-07, National Institute of Aging,

Kierownik (Principal Investigator) – Prof. Martin Sadowski/Prof. Ann Marie Schmidt, New York University School of Medicine

Rola: współwykonawca (associate research scientist) – samodzielny pracownik naukowy

Projekt: *Innowacyjna strategia diagnostyki, profilaktyki i adiuwantowej terapii wybranych schorzeń neurodegeneracyjnych w populacji polskiej.* Akronim NeuStemGen w ramach umowy nr STRATEGMED1/234261/2/NCBR/2014

Rola: współwykonawca

2018

Projekt: *Określenie zmian morfologicznych i neurochemicznych w zakończeniach nerwowych wycinków skóry właściwej w neuropatii cukrzycowej. Badania pilotażowe.*

Nr. Grantu: 2017/01/X/NZ5/01350, finansowany przez NCN, konkurs Miniatura

Rola: kierownik i główny wykonawca

2017 – 2019

Projekt: *Receptor for AGE (RAGE) Signal Transduction in Amyotrophic Lateral Sclerosis: In Vivo Imaging and Novel Therapeutic Approaches*

Nr. Grantu: W81XWH-17-1-0346. Department of Defense, Theurapeutic Idea Award

Kierownik (Prinical Investigator) – Prof. Ann Marie Schmidt

Rola: współwykonawca (associate research scientist) – samodzielny pracownik naukowy

2019 – obecnie

Projekt: *Rola sygnalizacji Diaph1 w patogenezie neuropatii cukrzycowej*

Nr. Grantu: 2018/30/E/NZ5/00458, finansowany przez NCN, konkurs SONATA BIS

Rola: kierownik projektu (principal investigator)

https://projekty.ncn.gov.pl/index.php?projekt_id=419403

Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

1998 – 2002	Studenckie Anatomiczne Koło Naukowe
1998 – 2002	International Veterinary Student Association (IVSA)
2005 – 2007	Polskie Towarzystwo Anatomiczne
2008 – 2012	The Society of Neuroscience
2017 – 2019	The New York Academy of Sciences
2002 – obecnie	Polska Izba Lekarsko-Weterynaryjna

W żadnej z wymienionych organizacji nie pełniłam/pełnię żadnych dodatkowych funkcji poza członkostwem.

Informacja o odbytych stażach w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.

09 – 12. 2007	Staż naukowy <i>Wallenberg Neuroscience Centre, Lund University, Lund, Szwecja</i> Opiekun naukowy: Prof. Jia Yi Li, Laboratorium Prof. Patrika Brudina Projekt: <i>Dystrybucja białek strefy aktywnej w układzie nerwowym szczura za pomocą badań biochemicznych i mikroskopu elektronowego</i>
08 – 12. 2005	Staż naukowy <i>Centre of Neuroanatomy, Faculty of Medicine – Charite, Berlin, Niemcy.</i> Opiekun naukowy: Prof. Gudrun Ahnert-Hilger. Projekt: <i>Monoaminergic system in GaO1 and GaO2 knockout mice - expression of vesicular transporters and catecholaminergic enzymes in central nervous system of GaO knock out animals</i>
2002 – 2007	Doktorant/Pracownik naukowo-dydaktyczny <i>Wydział Medycyny Wet i Bioinżynierii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn; Zajęcia z przedmiotów: anatomia weterynaryjna i ogólna anatomia zwierząt z elementami histologii.</i>

Członkostwo w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.).

- Polish Annals of Medicine: IF – 0,34, pkt MNiSW od 2019 – 40
– członek komitetu redakcyjnego
- Frontiers Publishing – Topic editor (redaktor tematyczny)
Frontiers Special Issue: diabetes and diabetic complications
Prace redakcyjne w toku, planowane wydanie zebranych artykułów – połowa 2021

Informacja o recenzowanych pracach naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.

Lista czasopism wraz z tytułami recenzowanych publikacji; Impact Factor (IF) lub jego odpowiednik Citescore oraz punkty MNiSW na podstawie najnowszych dostępnych danych (2019 – 2020) dostarczonych przez, odpowiednio, Journal Citation Report (Thomson Reuters) lub Scopus oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

1. Acta Neurologica Belgica: IF 1.989, pkt MNiSW - 40
 - *Amyotrophic Lateral Sclerosis With Coexisting Cancer A Single Center Study*
2. Ageing Research Reviews: IF 10.616, pkt MNiSW - 140
 - *Omic-based exploration and functional validation of neurotrophic factors and histamine as therapeutic targets in ALS*
3. BioMed Research International: IF 2.276, pkt MNiSW - 70
 - *Advanced glycation end products induce proliferation and migration of human aortic smooth muscle cells through PI3K/AKT pathway*
4. BMC Endocrine Disorders: IF 1.994, pkt MNiSW - 70
 - *Skin AGEs and diabetic neuropathy*
5. Brain Sciences: IF 3.332, pkt MNiSW - 70
 - *Prognostic role of CSF β -amyloid 1-42/1-40 ratio in patients affected by Amyotrophic Lateral Sclerosis.*
6. Current Alzheimer Research: IF 3.047, pkt MNiSW - 100
 - *High Glucose Enhances Neurotoxicity and Inflammatory Cytokine Secretion by Stimulated Human Astrocytes*
7. Current Drug Safety: IF 1.22, pkt MNiSW - 40
 - *Immunomodulation in inflammatory neuropathies: rationale and safety*
8. Current Medicinal Chemistry: IF 4.184, pkt MNiSW -100
 - *Brain atrophy in multiple sclerosis: mechanisms, clinical relevance and treatment options*
9. European Journal of Neuroscience: IF 3.115 , pkt MNiSW - 100
 - *Possible mechanism for GARS-associated axonal neuropathy: Distal spinal muscular atrophy type V (dSMA-V)*
 - *Nerve regeneration in chitosan conduits (BIOHYBRID®) and in autologous nerve grafts in healthy and in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats*
10. Family Medicine and Primary Care Review: IF 0.34, pkt MNiSW - 20
 - *Pourazowe uszkodzenia nerwów obwodowych*
 - *Metodologia i zastosowania kliniczne wysokorozdzielczej ultrasonografii nerwów*
 - *Wkład Profesor Ireny Hausmanowej-Petrusewicz w rozwój genetyki chorób nerwowo-mięśniowych*
 - *Cell adhesion molecules and their possible role in the pathology of the peripheral nerves - a review of the literature*
 - *Current trends in travel medicine*
 - *Profile of medical information searched by Polish travelers*
 - *Prolonged exposure to transdermal nicotine improves memory in male mice but increases cholesterol and transaminase activity in blood sera*
 - *Auditory perception in children with disorders of muscle tension*
 - *Biochemical parameters of patients with clinically silent cerebral lesions depend on sex - a preliminary study*

11. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*: IF 5.186, pkt MNiSW - 70
 - *The impact of diabetic conditions and AGE/RAGE signaling on cardiac fibroblast Migration*
12. *International Journal of Environmental Research and Public Health*: IF 2.849, pkt MNiSW - 70
 - *A Replication Study Identified Seven SNPs Associated with Quantitative Traits of Type 2 Diabetes among Chinese Population in A Cross Sectional Study*
 - *Type 2 diabetes prevention for "at risk" populations*
13. *International Journal of Molecular Sciences*: IF 4.556, pkt MNiSW - 100
 - *High-Mobility Group Box 1 Protein Signaling in painful diabetic neuropathy*
 - *Antibiotic potentiation of natural products: A promising target to fight bacteria*
14. *Journal of Chemical Neuroanatomy*: IF 2.353, pkt MNiSW - 70
 - *Ontogenetic development of neurons expressing calcium-binding proteins in the septum of the guinea pig: late onset of parvalbumin immunoreactivity versus calbindin and calretinin*
 - *Innervation pattern of polycystic ovaries in the women*
15. *Journal of Neuroinflammation*: IF 5.793 , pkt MNiSW - 100
 - *Therapeutic blockade of HMGB1 reduces early motor deficits, but not survival in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*
16. *Neuropeptides*: IF 2.411, pkt MNiSW - 70
 - *Effect of NNGF (New Neuronal Growth Factor) on Healing of Sciatic Nerve in Rats shows improvement as compared to the previous version, however there are still a couple of issues.*
17. *Pharmaceutical Biology*: IF 2.971, pkt MNiSW - 70
 - *Myricetin Improves Impaired Nerve Functions in Experimental Diabetic Rats: Involvement of Nrf2/HO-1 Pathway*
18. *Proteomics*: IF 2.77 , pkt MNiSW - 20
 - *The Proteome of the Murine Presynaptic Active Zone*
19. *Toxicological and Environmental Chemistry*: IF 1.05, pkt MNiSW - 40
 - *Atrazine and mancozeb induce cytotoxicity and alter excitation/inhibition balance in primary cultures of mouse cerebellar cortex*

Informacja o uczestnictwie w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych

- 01 – 04. 2006 **Stypendium Europejskiej Organizacji Biologii Molekularnej (EMBO)**
Wallenberg Neuroscience Centre, Lund University, Lund, Szwecja
 Opiekun Naukowy: Prof. Jia Yi Li. Projekt: *Axonal transport and distribution of active zone proteins in rat peripheral nervous system – ligation studies.*
09. 2003-09. 2004 **Stypendium Marie Curie (Piąty Program Ramowy)**
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Goettingen, Niemcy
 Opiekun Naukowy: Prof. Reinhard Jahn, Max Planck Institute Director
 Projekty: *Analysis of exocytotic sites in neuroendocrine cells by fluorescence video microscopy, Distribution of active zone proteins in rat peripheral neuromuscular junctions – morphological studies.*

Informacja o udziale w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt. II.9.

1. Współpraca naukowa z prof. Thomasem Brannagan z Instytutu Neurologii Uniwersytetu Columbia w badaniach patogenezы neuropatii obwodowych (lata 2010-15)
2. Współpraca naukowa z prof. Joanna Wojtkiewicz i współpracownikami z Wydziału Lekarskiego w badaniach pochodzenia i kodowania neurochemicznego neuronów wybranych autonomicznych jąder i zwojów świni domowej (lata 2011 – 2017)
3. Współpraca naukowa z dr hab. Martą Banach i współpracownikami z Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego w badaniach patofizjologii, profilaktyki i leczeniu neuropatii obwodowych (szczegółowe informacje w Autoreferacie, od 2010 do chwili obecnej)

Informacja o uczestnictwie w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny

Narodowa agencja wymiany naukowcy – przyjęcie do bazy ekspertów (grudzień 2020)

III. INFORMACJA O WSPÓLPRACY Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM

1. Wykaz dorobku technologicznego – nie dotyczy
2. Informacja o współpracy z sektorem gospodarczym

Udział w regionalnej edycji programu I-CORPS wspieranego przez National Science Foundation mającym na celu ułatwianie współpracy między środowiskiem akademickim i biznesowym oraz umożliwiającym pozyskiwanie środków na wdrażanie w praktykę idei naukowych o potencjale technologicznym

<http://www.nycrin.org/sites/about/>

3. Uzyskane prawa własności przemysłowej, w tym uzyskane patenty, krajowe lub międzynarodowe - nie dotyczy
4. Informacja o wdrożonych technologiach – nie dotyczy
5. Informacja o wykonanych ekspertyzach lub innych opracowaniach wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców – nie dotyczy
6. Informacja o udziale w zespołach eksperckich lub konkursowych – nie dotyczy
7. Informacja o projektach artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi – nie dotyczy

IV. INFORMACJE NAUKOMETRYCZNE

Informacje naukometryczne podane są na podstawie bazy danych Web of Science or Google Scholar, informacja o impact factor na podstawie bazy danych Journal Citation Reports (JCR) lub/jeśli w bazie JCR niedostępne – na podstawie Scopus Cite Records; punkty ministerialne czasopism podane na podstawie baz danych MNiSW obowiązujących do końca roku 2018 oraz po wprowadzeniu Ustawy o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018, Dz. U. 2018 poz. 1668, zgodnie z danymi bibliograficznymi umieszczonymi w bazie danych Expertus prowadzonej przez Bibliotekę Uniwersytecką Uniwersytetu Warmińsko- Mazurskiego w Olsztynie.

1. Impact Factor:

Informacja o punktacji Impact Factor (w dziedzinach i dyscyplinach, w których parametr ten jest powszechnie używany jako wskaźnik naukometryczny).

Łączny Impact Factor wynosi: 82.077

2. Informacja o liczbie cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań.

Liczba cytowań wyliczając autocytowania – 448, liczba autocytowań – 26 (web of science)

3. Informacja o posiadanym indeksie Hirscha: h-index 12,

4. Informacja o liczbie punktów MNiSW: 895

9.03.2021

