PODPIS ZAUFANY
DOMINIKA
DRULIS-FAJDASZ
04.11.2025 13:35:08 GMT+1
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Załącznik 3
Do wniosku z dnia 3 listopada 2025
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

ZAHAMOWANIE ROZKŁADU GLIKOGENU, czyli TERAPIA ANTY-STARZENIOWA

Dziedzina NAUKI ŚCISŁE I PRZYRODNICZE

Dyscyplina NAUKI BIOLOGICZNE

dr Dominika Drulis-Fajdasz

ORCID ID: 0000-0003-2392-4831 ()

Scopus ID : 22979081000

WoS ID: ABI-6503-2020

Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej

Wydział Nauk Biologicznych

Uniwersytet Wrocławski

Wrocław 2025

Spis treści

1. Imię i nazwisko. 3

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej. 3

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych. 3

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnieć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej. 4

4.1. Wykaz osiągnięć naukowych (OSIĄGNIĘCIE nr I i nr II) 4

4.2. Wykaz publikacji wybranych do Cyklu Powiązanych Tematycznie Artykułów Naukowych dla OSIĄGNIĘCIA nr I i OSIĄGNIĘCIA nr II 4

4.2.1. Publikacje dla OSIĄGNIĘCIA nr I - Analiza procesu fizjologicznego starzenia się wybranych struktur mózgowych. 5

4.2.2. Publikacje dla OSIĄGNIĘCIA nr II - Analiza plastyczności synaptycznej oraz zdolności kognitywnych zwierząt w różnym wieku w zależności od dostępności glikogenu jako źródła energii. 6

4.3. Opis wkładu własnego dla publikacji wybranych do Cyklu Powiązanych Tematycznie Artykułów Naukowych dla OSIĄGNIĘĆ nr I oraz nr II. 7

4.4. OSIĄGNIĘCIE nr I - ANALIZA PROCESU FIZJOLOGICZNEGO STARZENIA SIĘ WYBRANYCH STRUKTUR MÓZGOWYCH 12

4.4.1. Podsumowanie OSIĄGNIĘCIE nr I 20

4.5. OSIĄGNIĘCIE nr II – ANALIZA PLASTYCZNOŚ SYNAPTYCZNEJ ORAZ ZDOLNOŚCI KOGNITYWNYCH ZWIERZĄT W RÓŻNYM WIEKU W ZALEŻNOŚCI OD DOSTĘPNOŚCI GLIKOGENU JAKO ŹRÓDŁA ENERGII. 21

4.5.1. Podsumowanie OSIĄGNIĘCIA nr II. 30

4.6. Plany BADAWCZE. 32

4.7. Bibliografia: 33

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej..... 36

5.1. Etap nr I (1995-2000): Studia dzienne na Wydziale Nauk Przyrodniczych, kierunek Biotechnologia Uniwersytet Wrocławki. 37

5.2. Etap nr II (2000– 2006): Studia doktoranckie na Wydziale Nauk Przyrodniczych, kierunek Biotechnologia Uniwersytet Wrocławki, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Zakład Inżynierii Białka, pod opieką prof. Jacka Otlewskiego. 37

5.3. Etap III (2005-2010): Praca na stanowisku techniczno-naukowym - Laboratorium Immunologii Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademicki Szpital Kliniczny we Wrocławiu oraz Laboratorium Specjalistycznym Katedry i Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, pod opieką prof. Mariana Klingera. 39

5.4. Etap IV (od 2010-2025): Praca na stanowisku adiunkta, Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, pod opieką prof. Dariusza Rakusa. 43

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę 51

6.1. Dydaktyka w ramach pensum na Uniwersytecie Wrocławskim. 51

6.2. Opieka promotorska. 52

6.3. Organizacja konferencji. 53

6.4. Koło naukowe. 54

6.5. Popularyzacja nauki: 54

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej. 54

7.1. Szkolenia i podnoszenie kompetencji: 55

7.2. Nagrody. 57

1. Imię i nazwisko.

Dominika Drulis-Fajdasz

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

28 listopada 2006 Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie Biochemii ze specjalnością Biologii Molekularnej, Kierunek Biotechnologia, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, Polska

Praca pt: „Peptydy oddziałujące z małymi białkami G"; Zakład Inżynierii Białka Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski, Polska

pod opieką prof. Jacka Otlewskiego.

14 lipca 2000 Tytuł zawodowy magistra biotechnologii z wynikiem bardzo dobrym, Kierunek Biotechnologia, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski, Polska

Praca pt.: „Konstrukcja biblioteki drugiej domeny mysiego czynnika transkrypcyjnego Zif 268.2 prezentowanej na powierzchni faga M13"; Zakład Inżynierii Białka, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski, Polska

pod opieką prof. Jacka Otlewskiego.

1998 Tytuł zawodowy licencjata z wynikiem bardzo dobrym, Kierunek Biotechnologia, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski, Polska

Praca pt.: „Nowe generacje szczepionek przeciwbakteryjnych"; Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych. Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, Polska

pod opieką prof. Andrzeja Gamiana.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

od 2010 Adiunkt Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski. ul. Sienkiewicza 21, 50-335 Wrocław, Polska (tel./fax. 71 375 40 56)

2007-2010 Specjalista na stanowisku naukowo - technicznym Laboratorium Immunochemii, Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademia Medyczna we Wrocławiu, Polska (obecnie Uniwersytet Medyczny)

2005-2007 Asystent-technik Laboratorium Immunologii Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademicki Szpital Kliniczny we Wrocławiu, Polska

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnieć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

4.1. Wykaz osiągnięć naukowych (OSIĄGNIĘCIE nr I i nr II).

Jako osiągnięcia naukowe, stanowiące podstawę do wszczęcia postępowania habilitacyjnego w dziedzinie nauk biologicznych, chciałabym wskazać Osiągniecie nr I i nr II (zatytułowane poniżej), a które omawiam szczegółowo odpowiednio w Rozdziale 4.4 oraz Rozdziale 4.5.

OSIĄGNIĘCIE nr I

ANALIZA PROCESU FIZJOLOGICZNEGO STARZENIA SIĘ
WYBRANYCH STRUKTUR MÓZGOWYCH.

OSIĄGNIĘCIE nr II

ANALIZA PLASTYCZNOŚCI SYNAPTYCZNEJ ORAZ ZDOLNOŚCI KOGNITYWNYCH ZWIERZĄT W RÓŻNYM WIEKU
W ZALEŻNOŚCI OD DOSTĘPNOŚCI GLIKOGENU JAKO ŹRÓDŁA ENERGII.

4.2. Wykaz publikacji wybranych do Cyklu Powiązanych Tematycznie Artykułów Naukowych dla OSIĄGNIĘCIA nr I i OSIĄGNIĘCIA nr II.

Wykaz osiągnięć naukowych (Rozdział 4.1.), konstruuję na podstawie badań własnych zawartych w cyklu siedmiu powiązanych tematycznie oryginalnych artykułów naukowych oraz jednego opublikowanego doniesienia pokonferencyjnego (zgodnie z zasadami art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce). W poniższych podrozdziałach wypunktowano publikacje prezentujące eksperymenty, wyniki i dyskusje, dotyczące odpowiednio OSIĄGNIĘCIA nr I (Rozdział 4.2.1.) oraz OSIĄGNIĘCIA nr II (Rozdział 4.2.2.). Numeracja artykułów 1# - 8# jest zgodna z kolejnością ich publikacji.

Pełna lista chronologiczna moich publikacji znajduje się w Załączniku nr 4 do wniosku o wszczęcie postępowania o nadanie tytułu doktora habilitowanego.

4.2.1. Publikacje dla OSIĄGNIĘCIA nr I - Analiza procesu fizjologicznego starzenia się wybranych struktur mózgowych.

1. 1#: Drulis-Fajdasz D, Wójtowicz T, Wawrzyniak M, Wlodarczyk J, Mozrzymas JW, Rakus D. Involvement of cellular metabolism in age-related LTP modifications in rat hippocampal slices. *Oncotarget*. 2015 Jun 10;6(16):14065-81. doi: 10.18632/oncotarget.4188. PMID: 26101857; PMCID: PMC4546452.

Oncotarget (IF: 5.159); 15 pkt. MNiSW

2. 2#: Drulis-Fajdasz D, Gizak A, Wójtowicz T, Wiśniewski JR, Rakus D. Aging-associated changes in hippocampal glycogen metabolism in mice. Evidence for and against astrocyte-to-neuron lactate shuttle. *Glia*. 2018 Jul;66(7):1481-1495. doi: 10.1002/glia.23319. Epub 2018 Mar 1. PMID: 29493012; PMCID: PMC6001795.

Glia (IF: 5.829); 40 pkt. MNiSW

3. 3#: Gostomska-Pampuch K and Drulis-Fajdasz D, Gizak A, Wiśniewski JR, Rakus D. Absolute Proteome Analysis of Hippocampus, Cortex and Cerebellum in Aged and Young Mice Reveals Changes in Energy Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 8;22(12):6188. doi: 10.3390/ijms22126188. PMID: 34201282; PMCID: PMC8229959.

International Journal of Molecular Science (Int J Mol Sci) (IF: 6.208); 140 pkt. MNiSW

4. 4#: Drulis-Fajdasz D, Gostomska-Pampuch K, Duda P, Wiśniewski JR, Rakus D. Quantitative Proteomics Reveals Significant Differences between Mouse Brain Formations in Expression of Proteins Involved in Neuronal Plasticity during Aging. *Cells*. 2021 Aug 7;10(8):2021. doi: 10.3390/cells10082021. PMID: 34440790; PMCID: PMC8393337.

Cells (IF: 7.666); 140 pkt. MNiSW

5. 7#: Drulis-Fajdasz D, Krzystyniak A, Puścian A, Pytyś A, Gostomska-Pampuch K, Pudełko-Malik N, Wiśniewski JŁ, Młynarz P, Miazek A, Wójtowicz T, Włodarczyk J, Duś-Szachniewicz K, Gizak A, Wiśniewski JR, Rakus D. Glycogen phosphorylase inhibition improves cognitive function of aged mice. *Aging Cell*. 2023 Sep;22(9):e13928. doi: 10.1111/acel.13928. Epub 2023 Jul 31. Erratum in: *Aging Cell*. 2023 Dec;22(12):e14026. doi: 10.1111/acel.14026. PMID: 37522798; PMCID: PMC10497847.

Aging Cell (IF: 8.0); 140 pkt. MNiSW

6. 8#: Pudełko-Malik N, Drulis-Fajdasz D, Pruss Ł, Mielko-Niziałek KA, Rakus D, Gizak A, Młynarz P. A single dose of glycogen phosphorylase inhibitor improves cognitive functions of aged mice and affects the concentrations of metabolites in the brain. *Sci Rep*. 2024 Oct 15;14(1):24123. doi: 10.1038/s41598-024-74861-z. PMID: 39406810; PMCID: PMC11480434.

Scientific Reports (Sci Rep) (IF: 3.8); 140 pkt. MNiSW

4.2.2. Publikacje dla OSIĄGNIĘCIA nr II - Analiza plastyczności synaptycznej oraz zdolności kognitywnych zwierząt w różnym wieku w zależności od dostępności glikogenu jako źródła energii.

Badanie zmian zachodzących w organizmach młodych i starych po zastosowaniu inhibitora rozkładu glikogenu (BAY U6751) otwiera nowe zagadnienie badawcze, w ramach którego analizowane jest pośrednio działanie mleczanowego czółenka astrocytarno-neuronowego (ANLS).
Dla **OSIĄGNIĘCIA nr II** uwzględniono m.in. artykuły **1#, 7#** i **8#**, które zostały również włączone do cyklu prac tematycznych tworzących **OSIĄGNIĘCIE nr I**. W wymienionych publikacjach zastosowanie inhibitora BAY U6751 stanowi odrębny wątek eksperymentalny i analityczny.
Natomiast artykuły **5#** i **6#** są unikatowe dla **OSIĄGNIĘCIA nr II** i poświęcone wyłącznie badaniom związanym z zastosowaniem inhibitora BAY U6751.

1. 1#: Drulis-Fajdasz D, Wójtowicz T, Wawrzyniak M, Wlodarczyk J, Mozrzymas JW, Rakus D. Involvement of cellular metabolism in age-related LTP modifications in rat hippocampal slices. *Oncotarget*. 2015 Jun 10;6(16):14065-81. doi: 10.18632/oncotarget.4188. PMID: 26101857; PMCID: PMC4546452.

Oncotarget (IF: 5.159); 15 pkt. MNiSW

2. 5#: Pudelko-Malik N, Wiśniewski J, Drulis-Fajdasz D, Mlynarz P. Validated liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of glycogenolysis phosphorylase inhibitor in mouse tissues - 5-isopropyl-4-(2-chlorophenyl)-1-ethyl-1,4-dihydro-6-methyl-2,3,5-pyridinetricarboxylic acid ester disodium salt hydrate. *J Sep Sci*. 2022 Oct;45(20):3791-3799. doi: 10.1002/jssc.202200454. Epub 2022 Sep 7. PMID: 35964279.

Journal of Separation Science (J Sep Sci) (IF: 3.1); 70 pkt. MNiSW

3. 6#: *FEBS Open Bio*; 2022; Journal article; Drulis-Fajdasz, D.; Krzystyniak, A.; Gostomska-Pampuch, K.; Wisniewski, J. R.; Pudelko-Malik, N.; Wisniewski, J. L.; Mlynarz, P.; Rakus, D; Inhibition of glycogen phosphorylase counteracts age-related defects in memory formation; Volume12; Page56-56; Supplement1; Special IssueSI; Meeting Abstract ShT-01.5-1; JUL 2022; ISSN 2211-5463; Current Publisher: WILEY111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ, Journal Impact Factor 2.6; https://publons.com/wos-op/publon/57728196/

FEBS Open Bio (IF: 2.6); 0 pkt. MNiSW

4. 7#: Drulis-Fajdasz D, Krzystyniak A, Puścian A, Pytyś A, Gostomska-Pampuch K, Pudełko-Malik N, Wiśniewski JŁ, Młynarz P, Miazek A, Wójtowicz T, Włodarczyk J, Duś-Szachniewicz K, Gizak A, Wiśniewski JR, Rakus D. Glycogen phosphorylase inhibition improves cognitive function of aged mice. *Aging Cell*. 2023 Sep;22(9):e13928. doi: 10.1111/acel.13928. Epub 2023 Jul 31. Erratum in: *Aging Cell*. 2023 Dec;22(12):e14026. doi: 10.1111/acel.14026. PMID: 37522798; PMCID: PMC10497847.

Aging Cell (IF: 8.0); 140 pkt. MNiSW

5. 8#: Pudełko-Malik N, Drulis-Fajdasz D, Pruss Ł, Mielko-Niziałek KA, Rakus D, Gizak A, Młynarz P. A single dose of glycogen phosphorylase inhibitor improves cognitive functions of aged mice and affects the concentrations of metabolites in the brain. *Sci Rep*. 2024 Oct 15;14(1):24123. doi: 10.1038/s41598-024-74861-z. PMID: 39406810; PMCID: PMC11480434.

Scientific Reports (Sci Rep) (IF: 3.8); 140 pkt. MNiSW

4.3. Opis wkładu własnego dla publikacji wybranych do Cyklu Powiązanych Tematycznie Artykułów Naukowych dla OSIĄGNIĘĆ nr I oraz nr II.

1. **1#: Drulis-Fajdasz D, Wójtowicz T, Wawrzyniak M, Wlodarczyk J, Mozrzymas JW, Rakus D. Involvement of cellular metabolism in age-related LTP modifications in rat hippocampal slices.** *Oncotarget.* **2015 Jun 10;6(16):14065-81. doi: 10.18632/oncotarget.4188. PMID: 26101857; PMCID: PMC4546452.**

***Oncotarget* (IF: 5.159); 15 pkt. MNiSW**

Wkład własny:

Byłam odpowiedzialna za organizację przebiegu wszystkich eksperymentów (planowania czasowe i dystrybucję zasobów w projekcie), począwszy od organizacji harmonogramu zakupu, transportu i wieloetapowych analiz zwierząt (co szczególnie kluczowe było w przypadku zwierząt starych), poprzez prowadzenie eksperymentów, po logistykę zabezpieczania materiału biologicznego do późniejszych analiz (pobrania, utrwalania i transportu).

Współtworzyłam koncepcję badań (dobór technik pomiarowych) i opracowałam wyniki wstępne, które pozwoliły na ustalenie protokołu pomiarów elektrofizjologicznych. Przeprowadziłam 95% opisanych w pracy pomiarów elektrofizjologicznych na skrawkach hipokampalnych oraz uczestniczyłam w opracowaniu tychże wyników.

Ponadto dostosowałam i zastosowałam zmieniony przeze mnie protokół barwień w tkance w metodzie hybrydyzacji in situ (FISH) z nowym schemacie, połączonym z barwieniem immunofluorescencyjnym (IF), co dało możliwość jednoczesnej analizy dwóch subpopulacji komórek (neuronów i osobno astrocytów). Przeprowadziłam wszystkie barwienia z metodą „FISH + IF" w preparatach hipokampalnych oraz cała analizę na obecność mRNA wybranych białek w tkance nerwowej.

Wykonałam barwienia immunohistologiczne (IHC) na obecność beta-amyloidu w skrawkach hipokampalnych.

Koordynowałam przepływ materiału badawczego, informacji i dyskusji naukowych pomiędzy naszym Zakładem a pracownikami prof. Jakuba Włodarczyka z Warszawy, przy obrazowaniu tkanek i analizie morfologii kolców dendrytycznych. Ponadto, uczestniczyłam w analizie danych otrzymanych z barwień metodą z wykorzystaniem techniki „gene gun".

Opracowałam wyniki, brałam udział w ich interpretacji i dyskusji. Przygotowałam wersję roboczą manuskryptu oraz końcową wersję pracy (szczególnie wyniki zawarte na Rycinach 3, 4, 5 i 6).

2. **2#: Drulis-Fajdasz D, Gizak A, Wójtowicz T, Wiśniewski JR, Rakus D. Aging-associated changes in hippocampal glycogen metabolism in mice. Evidence for and against astrocyte-to-neuron lactate shuttle.** *Glia.* **2018 Jul;66(7):1481-1495. doi: 10.1002/glia.23319. Epub 2018 Mar 1. PMID: 29493012; PMCID: PMC6001795.**

***Glia* (IF: 5.829); 40 pkt. MNiSW**

Wkład własny:

Byłam odpowiedzialna za organizację przebiegu wszystkich eksperymentów w naszym Zakładzie (planowania czasowe i dystrybucję zasobów w projekcie), począwszy od organizacji harmonogramu zakupu odczynników czy transportu zwierząt (co szczególnie kluczowe było w przypadku starych zwierząt), poprzez prowadzenie eksperymentów, po logistykę zabezpieczania materiału biologicznego np. do późniejszych analiz proteomicznych (pobrania, zabezpieczania i transportu).

Uczestniczyłam w opracowaniu wyników proteomicznej bazy danych skrawków hipokampalnych, pod kątem białek zaangażowanych w metabolizm energetyczny tkanki nerwowej.

Wykonałam wszystkie opisane w pracy barwienia immunofluorescencyjne na obecność wybranych białek zaangażowanych w metabolizm komórki w preparatach hipokampalnych, dla wybranych stref regionu CA1 (SP- *stratum pyramidale* vs SR – *stratum radiatum*) oraz wykonałam pełną analizę tychże eksperymentów.

Współtworzyłam koncepcję badań i protokołu postępowania w analizach poziomu mRNA (dokonałam doboru technik izolacji mRNA, odwrotnej transkrypcji, projektowania sond do real-time PCR). Opracowałam wyniki wstępne, które pozwoliły na ustalenie protokołu preparatyki wybranej strefy hipokampalnej *stratum pyramidale* CA1 (SP *Cornu ammonis*). Przeprowadziłam wszystkie opisane w pracy pomiary związane z real-time PCR na skrawkach hipokampalnych oraz uczestniczyłam w opracowaniu tychże wyników.

Opracowałam wyniki, brałam udział w ich interpretacji i dyskusji. Przygotowałam wersję roboczą manuskryptu oraz końcową wersję pracy (szczególnie wyniki zawarte na Rycinach 3, 4, 5, 6, 7 i 8).

3. **3#: Gostomska-Pampuch K and Drulis-Fajdasz D, Gizak A, Wiśniewski JR, Rakus D. Absolute Proteome Analysis of Hippocampus, Cortex and Cerebellum in Aged and Young Mice Reveals Changes in Energy Metabolism.** *Int J Mol Sci*. **2021 Jun 8;22(12):6188. doi: 10.3390/ijms22126188. PMID: 34201282; PMCID: PMC8229959.**

***International Journal of Molecular Science (Int J Mol Sci)* (IF: 6.208); 140 pkt. MNiSW**

Wkład własny:

Razem z pierwszym autorem publikacji (Kingą Gostomska-Pampuch) mam równy wkład w powstanie pracy oryginalnej, co jest oznaczone w afiliacjach dla autorów artykułu.

Byłam odpowiedzialna za przygotowanie kohorty zwierząt laboratoryjnych, preparatykę, zabezpieczanie i transport pobranych struktur mózgowych, które stały się materiałem biologicznym do analiz proteomicznych.

Opracowałam analizę proteomicznych baz danych dla hipokampu, kory i móżdżku dla zwierząt młodych i starych pod kątem ogólnych parametrów zmienności w profilu białkowego (Rycina 2).

Dodatkowo, w wyniku przeprowadzonej szczegółowej analizie baz danych proteomicznych, przygotowałam wyniki zawarte na Rycinach 3, 4, 5, 6 i 7.

Opracowałam wyniki, brałam udział w ich interpretacji i dyskusji. Przygotowałam wersję roboczą manuskryptu oraz końcową wersję pracy.

4. **4#: Drulis-Fajdasz D, Gostomska-Pampuch K, Duda P, Wiśniewski JR, Rakus D. Quantitative Proteomics Reveals Significant Differences between Mouse Brain Formations in Expression of Proteins Involved in Neuronal Plasticity during Aging.** *Cells*. **2021 Aug 7;10(8):2021. doi: 10.3390/cells10082021. PMID: 34440790; PMCID: PMC8393337.**

***Cells* (IF: 7.666); 140 pkt. MNiSW**

Wkład własny:

Razem z drugim autorem publikacji (Kingą Gostomska-Pampuch) mam równy wkład w powstanie pracy oryginalnej, co jest oznaczone w afiliacjach dla autorów artykułu.

Byłam odpowiedzialna za przygotowanie kohorty zwierząt laboratoryjnych, preparatykę, zabezpieczanie i transport pobranych struktur mózgowych, które stały się materiałem biologicznym do analiz proteomicznych.

Opracowałam szczegółową analizę proteomicznych baz danych dla hipokampu, kory i móżdżku dla zwierząt młodych i starych. Moja analiza pozwoliła na otrzymanie wyników prezentowanych na Rycinie 7, 8, i 9. Ta część dotyczyła białek zaangażowanych w tworzenie połączeń synaptycznych i została uzupełniona o przegląd literaturowy zawarty schematycznie w Tabeli 1 i 2.

Współtworzyłam pozostałe wyniki analizy naszej proteomicznej bazy danych, które zostały zaprezentowane na rycinach 1, 2, 3, 4, 5 i 6. Brałam udział w ich interpretacji, opracowaniu i dyskusji.

Przygotowałam wersję roboczą manuskryptu oraz końcową wersję pracy, w szczególności z zakresie i tematyce prezentowanych danych i na etapie przygotowanych przez ze mnie wszystkich rycin.

5. **5#: Pudelko-Malik N, Wiśniewski J, Drulis-Fajdasz D, Mlynarz P. Validated liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of glycogenolysis phosphorylase inhibitor in mouse tissues - 5-isopropyl-4-(2-chlorophenyl)-1-ethyl-1,4-dihydro-6-methyl-2,3,5-pyridinetricarboxylic acid ester disodium salt hydrate.** *J Sep Sci.* **2022 Oct;45(20):3791-3799. doi: 10.1002/jssc.202200454. Epub 2022 Sep 7. PMID: 35964279.**

***Journal of Separation Science (J Sep Sci)* (IF: 3.1); 70 pkt. MNiSW**

Wkład własny:

Jako promotor pomocniczy pracy doktorskiej Natalii Pudełko-Malik, byłam odpowiedzialna za merytoryczne i formalne przygotowanie eksperymentów, które pozwoliły na pozyskanie materiału badawczego do badania poziomu inhibitora BAY w tkankach, które to analizy są głównym zagadnieniem niniejszej publikacji.

Byłam odpowiedzialna za uzyskanie zgody Komisji Etycznej na przeprowadzenie procedur na zwierzętach, gdzie głównym zadaniem było podanie dootrzewnowe inhibitora BAY U6751 i pobranie tkanek do dalszych analiz.

Jako osoba wyznaczona do planowania i przeprowadzania procedur na zwierzętach w naszym Zakładzie, na poczet tej publikacji kolejno: przygotowałam odpowiednie kohorty zwierząt, przeprowadziłam procedury podania inhibitora, pobrałam tkanki i zabezpieczyłam do późniejszych eksperymentów.

Brałam udział w interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników LC-MS. Redagowałam wersję roboczą manuskryptu.

6. **6#:** *FEBS Open Bio*; **2022; Journal article; Drulis-Fajdasz, D.; Krzystyniak, A.; Gostomska-Pampuch, K.; Wisniewski, J. R.; Pudelko-Malik, N.; Wisniewski, J. L.; Mlynarz, P.; Rakus, D; Inhibition of glycogen phosphorylase counteracts age-related defects in memory formation; Volume12; Page56-56; Supplement1; Special IssueSI; Meeting Abstract ShT-01.5-1; JUL 2022; ISSN 2211-5463; Current Publisher: WILEY111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ, Journal Impact Factor 2.6; https://publons.com/wos-op/publon/57728196/**

***FEBS Open Bio* (IF: 2.6); 0 pkt. MNiSW**

Wkład własny:

Jest to artykuł opublikowany jako doniesienie pokonferencyjne. Zostały tu przeze mnie przedstawione wyniki, które stały się podstawą do większej publikacji nr 7#, a opracowanej w kolejnym roku.

Byłam odpowiedzialna za przygotowanie zgłoszenia konferencyjnego, a później za przygotowanie prezentacji i moje 15 min-owe wystąpienie na panelu konferencyjnym, gdzie zostałam wyróżniona pośród nadesłanych abstraktów do prezentacji ustnej.

7. **7#: Drulis-Fajdasz D, Krzystyniak A, Puścian A, Pytyś A, Gostomska-Pampuch K, Pudełko-Malik N, Wiśniewski JŁ, Młynarz P, Miazek A, Wójtowicz T, Włodarczyk J, Duś-Szachniewicz K, Gizak A, Wiśniewski JR, Rakus D. Glycogen phosphorylase inhibition improves cognitive function of aged mice.** *Aging Cell*. **2023 Sep;22(9):e13928. doi: 10.1111/acel.13928. Epub 2023 Jul 31. Erratum in:** *Aging Cell*. **2023 Dec;22(12):e14026. doi: 10.1111/acel.14026. PMID: 37522798; PMCID: PMC10497847.**

***Aging Cell* (IF: 8.0); 140 pkt. MNiSW**

Wkład własny:

Byłam odpowiedzialna za organizację przebiegu wszystkich eksperymentów - planowania czasowe, organizację przestrzeni dla eksperymentów behawioralnych, dystrybucję zasobów ludzkich w projekcie. Koordynowałam harmonogramu zakupu, transportu i wieloetapowych analiz zwierząt (co szczególnie kluczowe było w przypadku zwierząt starych), prowadziłam eksperymenty przy współpracy z grupą prof. Jakuba Włodarczyka we Wrocławiu i w Warszawie. Ponadto projektowałam schemat i zakres zabezpieczania materiału biologicznego do późniejszych analiz (pobrania, utrwalania i transportu), które stanowiły punkt wyjścia dla niniejszej pracy, ale które również dały rezultaty jeszcze nie opublikowane – dane w opracowaniu.

Byłam odpowiedzialna za uzyskanie dwóch pozytywnych wniosków do Komisji Etycznej na przeprowadzenie procedur na zwierzętach, gdzie głównym zadaniem było podanie dootrzewnowe inhibitora BAY U6751 i przeprowadzanie testów behawioralnych oraz pobranie tkanek do dalszych analiz.

Jako osoba wyznaczona do planowania i przeprowadzania procedur na zwierzętach w naszym Zakładzie, na poczet tej publikacji kolejno: przygotowałam odpowiednie kohorty zwierząt, przeprowadziłam procedury podania inhibitora, przeprowadziłam testy behawioralne (prezentowane na Rycinie 1 przy współpracy z Adamem Krzystyniakiem; prezentowane w Rycinie 2 – w pełni samodzielnie), pobrałam i zabezpieczyłam cały materiał biologiczny ze zwierząt do późniejszych pomiarów.

Samodzielnie zobrazowałam skrawki hipokampalne w metodzie barwienia *„gene gun"* i przeprowadziłam pełną analizę i interpretację morfologii kolców dendrytycznych (wyniki prezentowane na Rycinie 3 i 4).

Byłam odpowiedzialna za pobranie i zabezpieczenie tkanek na poczet pomiarów LC-MS dla danych proteomicznych.

Wykonałam wszystkie opisane w pracy barwienia immunofluorescencyjne na obecność wybranych białek w preparatach hipokampalnych, dla wybranych stref regionu CA1 oraz wykonałam pełną analizę tychże eksperymentów (dane z Rycin 7, 8 i 9).

Brałam udział w interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników, przygotowałam wersję roboczą manuskryptu oraz końcową wersję pracy, w szczególności z zakresie i tematyce prezentowanych danych (Ryciny 1, 2, 3, 4, 7, 8, i 9) plus rozbudowane materiały w suplementach do publikacji.

8. **8#: Pudełko-Malik N, Drulis-Fajdasz D, Pruss Ł, Mielko-Niziałek KA, Rakus D, Gizak A, Młynarz P. A single dose of glycogen phosphorylase inhibitor improves cognitive functions of aged mice and affects the concentrations of metabolites in the brain.** *Sci Rep*. **2024 Oct 15;14(1):24123. doi: 10.1038/s41598-024-74861-z. PMID: 39406810; PMCID: PMC11480434.**

***Scientific Reports (Sci Rep)* (IF: 3.8); 140 pkt. MNiSW**

Wkład własny:

Razem z pierwszym autorem publikacji (Natalią Pudełko-Malik) mam równy wkład w powstanie pracy oryginalnej, co jest oznaczone w afiliacjach dla autorów artykułu.

Jako promotor pomocniczy pracy doktorskiej Natalii Pudełko-Malik, byłam odpowiedzialna za merytoryczne i formalne przygotowanie eksperymentów, które pozwoliły na pozyskanie materiału badawczego do uzyskania profilu metabolomicznego serii tkanek dla wszystkich grup zwierząt badanych.

Byłam odpowiedzialna za uzyskanie pozwolenia Komisji Etycznej na przeprowadzenie procedur na zwierzętach, gdzie głównym zadaniem było podanie dootrzewnowe inhibitora BAY U6751 i przeprowadzanie testów behawioralnych oraz pobranie tkanek do dalszych analiz.

Jako osoba wyznaczona do planowania i przeprowadzania procedur na zwierzętach w naszym Zakładzie, na poczet tej publikacji kolejno: przygotowałam odpowiednie kohorty zwierząt, przeprowadziłam procedury podania inhibitora, przeprowadziłam testy behawioralne (prezentowane na Rycinie 1) pobrałam i zabezpieczyłam materiał biologiczny do pomiarów metabolomicznych.

Ponadto, wspólnie z doktorantką, przeprowadziłam interpretację wyników, ich dyskusję i redakcję jako końcowe Ryciny 4, 5, 6 i 7 w publikacji.

Przygotowałam wersję roboczą manuskryptu oraz końcową wersję pracy.

4.4. OSIĄGNIĘCIE nr I - ANALIZA PROCESU FIZJOLOGICZNEGO STARZENIA SIĘ WYBRANYCH STRUKTUR MÓZGOWYCH.

Wiedza na temat budowy i funkcjonowania tkanki nerwowej oraz mózgu rozwija się dynamicznie, a mimo to wiele mechanizmów leżących u podstaw funkcjonowania sieci neuronowej pozostaje nadal nieznanych. Dotychczasowe badania koncentrują się na analizie aktywności pojedynczych komórek, takich jak neurony, oligodendrocyty, astrocyty czy mikroglej, które wspólnie tworzą tkankę nerwową. Wciąż jednak dysponujemy ograniczoną wiedzą na temat wzajemnych interakcji pomiędzy tymi komórkami, mimo że to właśnie one odgrywają kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu całego układu nerwowego. Dzięki tym interakcjom możliwe są złożone procesy, takie jak plastyczność synaptyczna, która leży u podstaw procesów uczenia się, zapominania oraz odtwarzania wspomnień.

Moja droga naukowa w dziedzinie neurobiologii rozpoczęła się w zakładzie profesora Dariusza Rakusa, gdzie zaangażowano mnie w projekt dotyczący badania aktywności komórek tkanki nerwowej. Tematem badań było funkcjonowanie tzw. **astrocytarno-neuronalnego czółenka mleczanowego** (ang. *astrocyte-neuronal lactate shuttle*, ANLS).

Model ANLS zakłada, że w wyniku interakcji pomiędzy astrocytami a neuronami dochodzi do przekazywania mleczanu, który – obok glukozy – stanowi istotne źródło energii dla neuronów. Teoria ta została zaproponowana przez Pierre'a Magistrettiego i współpracowników, którzy wykazali, że mleczan produkowany przez astrocyty jest niezbędny do prawidłowego tworzenia śladów pamięciowych i procesów uczenia się (Pellerin & Magistretti, 1994, 2012; Voutsinos-Porche et al., 2003).

Zgodnie z teorią ANLS, astrocyty przejmują glukozę z krwiobiegu i mogą ją magazynować jako glikogen, który stanowi rezerwuar metaboliczny. W warunkach wzmożonej aktywności neuronalnej, glikogen ulega rozkładowi do mleczanu, który następnie jest transportowany przez transportery monokarboksylanów (głównie MCT4 oraz MCT1) do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a stamtąd pobierany przez neurony (głównie poprzez MCT2). W neuronach mleczan ulega przekształceniu do pirogronianu i dalej jest włączany do cyklu Krebsa (TCA), co umożliwia produkcję ATP w procesach wymagających dużego nakładu energetycznego, takich jak przewodzenie impulsów i mechanizmy synaptyczne (Rozdział 4.5, Rycina 2)(Bélanger et al., 2011).

Od momentu opublikowania pierwszych prac na temat ANLS toczy się intensywna dyskusja dotycząca tego, który substrat energetyczny – glukoza czy mleczan – pełni podstawową rolę w metabolizmie neuronów. Istnieją badania wspierające hipotezę dominującej roli glukozy w pewnych warunkach (np. gdy transport mleczanu jest ograniczony), a także badania pokazujące, **że bez dostępności mleczanu funkcje pamięciowe są upośledzone** (Gibbs, Anderson, et al., 2006; Suzuki et al., 2011).

Wiadomo, że wraz z wiekiem funkcje tkanki nerwowej ulegają stopniowemu upośledzeniu, co znajduje odzwierciedlenie w pogarszaniu się funkcji poznawczych. Mając na uwadze naturalne zmiany fizjologiczne związane ze starzeniem się zwierząt, w ramach naszych badań podjęliśmy próbę odpowiedzi na pytanie, czy – a jeśli tak, to w jaki sposób – funkcjonowanie astrocytarno-neuronalnego czółenka mleczanowego (ANLS) zmienia się w zależności od wieku osobników.

Aby poprawnie przeprowadzić tę analizę, konieczne było wstępne zbadanie podstawowych parametrów plastyczności synaptycznej na poziomie tkankowym oraz funkcji poznawczych w różnych grupach wiekowych. Pierwszym i fundamentalnym osiągnięciem badawczym stała się zatem **analiza procesu fizjologicznego starzenia się wybranych struktur mózgowych**. W toku przeprowadzonych eksperymentów, których wyniki opublikowano w pracach wybranych do **Cyklu powiązanych tematycznie**

artykułów naukowych (1# - 4#, 6# - 8#), uzyskano szeroki obraz zmian zachodzących na poziomie komórkowym, tkankowym i organizmalnym.

W badaniach do grupy tzw. "zwierząt starych" kwalifikowano osobniki w wieku schyłkowym, które nie wykazywały współwystępowania patologii mogących istotnie zakłócić obraz naturalnego starzenia się (np. nowotworów, infekcji, chorób skórnych czy zaburzeń układu pokarmowego). Otrzymane dane odzwierciedlają zatem **proces fizjologicznego starzenia się**, niezaburzonego przez dodatkowe czynniki chorobowe. Badania takie należy uznać za unikatowe, ponieważ wymagają one długotrwałej selekcji kohorty oraz wieloletniej obserwacji zwierząt aż do momentu osiągnięcia zaawansowanego wieku.

W pierwszej fazie projektu przeprowadzono szereg badań na poziomie tkankowym (publikacja 1#). Analizie poddano izolowane skrawki hipokampalne szczurów, na których przeprowadzono serię pomiarów stymulacji prądowych, mających na celu **ocenę indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (z ang. *long-term potentiation*, LTP)**, uznawanego za kluczowy marker plastyczności synaptycznej (Malenka & Bear, 2004) (Rycina 1A). Porównanie aktywności tkanki w dwóch grupach wiekowych (szczury 1-miesięczne oraz 20–22-miesięczne) wykazało spodziewane, znaczące obniżenie zdolności do indukcji LTP w grupie zwierząt starszych. Przeprowadzone pomiary elektrofizjologiczne pozwoliły na otrzymanie puli preparatów tkankowych, zróżnicowanych względem aktywności sieci neuronalnej.

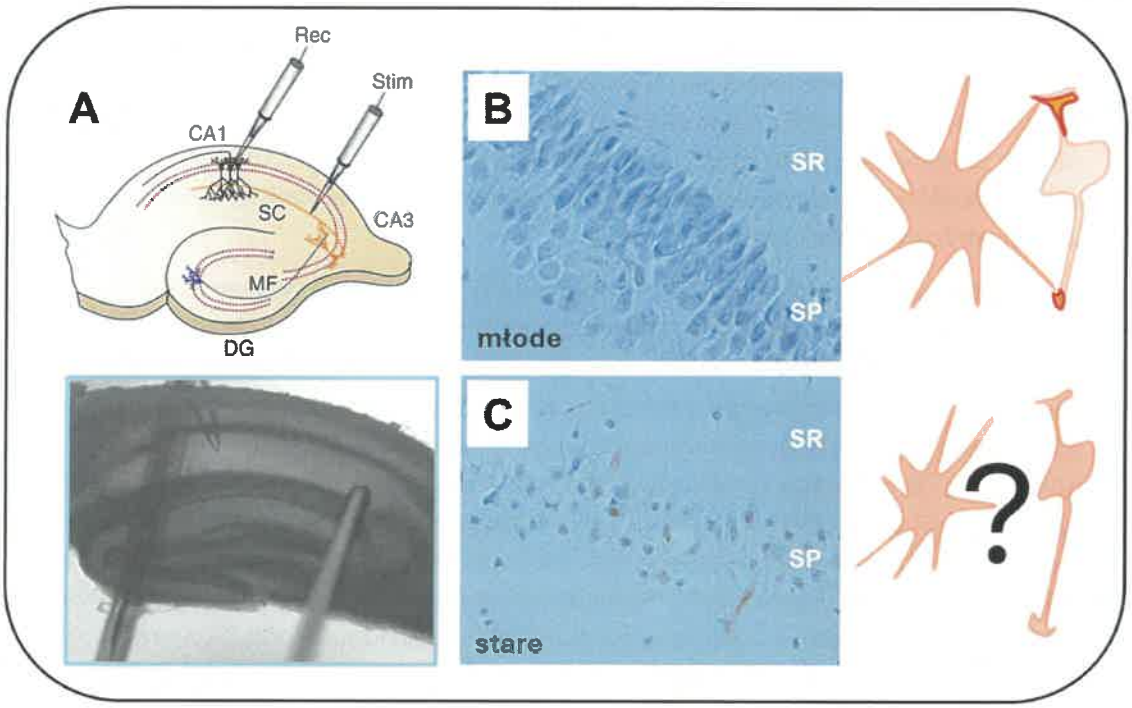
Coraz więcej wyników badań sugeruje, że związane z wiekiem pogorszenie funkcji poznawczych może być skutkiem zaburzeń metabolizmu energetycznego mózgu. Powstaje więc pytanie, czy da się wskazać konkretne zmiany metaboliczne, które mogłyby tłumaczyć obniżoną plastyczność synaptyczną obserwowaną w naszych eksperymentach?

Dlatego też kolejnym etapem badań była analiza ekspresji wybranych enzymów metabolicznych istotnych w kontekście badanej problematyki, takich jak syntetaza glutaminy (*Glns*), fosforylaza glikogenowa (*Pygb*) oraz syntaza glikogenowa (*Gys1*). Porównano zarówno grupy kontrolne, jak i tkanki poddane stymulacji elektrofizjologicznej: transmisji bazowej (BS, odpowiadającej wyjściowej aktywności synaptycznej w stanie spoczynku) oraz indukcji LTP poprzez stymulację wysokoczęstotliwościową (z ang. *high frequency stimulation*, HFS). Zastosowana przeze mnie autorska metoda podwójnego barwienia, łącząca hybrydyzację in situ (FISH) i barwienia immunofluorescencyjne (IF), umożliwiła wyznaczenie komórkowo-specyficznej lokalizacji dla analizowanych enzymów. Uzyskane wyniki wykazały **istotne różnice w poziomie ekspresji mRNA** pomiędzy grupami wiekowymi oraz odmienny wzorzec odpowiedzi na stymulację elektrofizjologiczną. W obu grupach wiekowych stymulacja typu BS prowadziła do wzrostu ekspresji genów, co można interpretować jako etap przygotowawczy do plastyczności indukowanej przez HFS. U młodych zwierząt stymulacja HFS nie wywoływała dalszego wzrostu poziomu mRNA dla *Gys1* i *Pygb*, natomiast obserwowano znaczący wzrost ekspresji *Glns* po indukcji LTP. Ponadto, największe zmiany występowały w astrocytach, podczas gdy w neuronach były one nieobecne lub znacznie słabsze.

W przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla 1 miesięcznych osobników, w skrawkach hipokampalnych pozyskanych od zwierząt starych, zarówno stymulacja typu BS jak i HFS, powodowały wyraźny wzrost poziomu mRNA w neuronach, co sugeruje istotne zmiany w komunikacji astrocyt-neuron. Nie można również wykluczyć, że ekspresja *Gys1* i *Pygb* w astrocytach jest regulowana przez nieznaną cząsteczkę uwalnianą z neuronów w odpowiedzi na zwiększone uwalnianie mleczanu z astrocytów, co może być zaburzone w tkance objętej fizjologicznymi procesami starzenia.

Odrębnym elementem badań była **analiza morfologii kolców dendrytycznych** – postsynaptycznych struktur obecnych w synapsach pobudzających. Dokonano ich klasyfikacji pod względem parametrów długości i szerokości, a następnie porównano profile morfologiczne pomiędzy grupami. Obserwowane zmiany kształtu kolców dendrytycznych obrazują plastyczność synaptyczną, gdzie przebudowa synaps świadczy o ich wzmocnieniu (wzroście) lub o zaniku połączeń synaptycznych (zmniejszaniu) (Berry & Nedivi, 2017). Zaobserwowano, iż w grupie starszej dominowały kolce krótsze i grubsze, a ponadto zmiany indukowane stymulacją LTP były mniej dynamiczne i osiągały niższą istotność statystyczną niż u zwierząt młodych.

Równolegle wykonano barwienia histochemiczne z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko β-amyloidowi. Wykazano, że jego obecność była wyraźnie większa w tkankach pochodzących od zwierząt starych niż u zwierząt młodych. Co istotne, stwierdzono również zmiany morfologiczne w obrębie regionów CA hipokampu (*Cornu ammonis 1*), polegające na zmniejszeniu objętości i liczby komórek warstwy *stratum pyramidale*, co stanowi pośredni dowód na dysfunkcję związaną z procesem starzenia się (Rycina 1B, C). Tak głębokie zmiany morfologiczne mogą zaburzać funkcjonowanie tzw. „synaps trójdzielnych", w których astrocyty odgrywają istotną rolę w komunikacji neuronalnej (Haber et al., 2006; Halassa et al., 2007). Zaburzenia te mogą prowadzić do **nieprawidłowej komunikacji pomiędzy komórkami** tworzącymi tkankę nerwową.



Rycina 1. (A) Schemat elektrofizjologicznej indukcji mechanizmów LTP w projekcji koraterale Schaffera–CA1 w izolowanych skrawkach hipokampalnych szczura (350 µm). (B, C) Barwienie IHC dla beta-amyloidu w skrawkach hipokmapalnych szczurów młodych (1-miesięcznych, (B)) oraz szczurów starych (22-24- miesięcznych (C)); region CA1, skrawki grubości 4µm. **Legenda**: CA1 - *Cornu ammonis* 1; SC - *Schaffer collateral*; MF – *Mossy fiber*; DG - *Dentate gyrus*; SR - *Stratum oriens;* SP - *Stratum pyramidale*; Stim – electrode stymulująca; Rec – elektroda rejestrująca. (Dane opracowano na podstawie publikacji 1#).

Zebrane wyniki publikacji 1# jednoznacznie wskazują, że proces starzenia się **negatywnie wpływa na zdolność do plastyczności synaptycznej,** co wiąże się zarówno ze zmianami strukturalnymi, jak i

osłabieniem mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za przebudowę synaps. Dane te stanowiły punkt wyjścia do dalszych badań, których celem była ocena roli czółenka astrocytarno-neuronalnego w regulacji metabolizmu, ekspresji genów, morfologii kolców dendrytycznych oraz efektywności indukcji LTP w warunkach zmienionej aktywności metabolicznej (Rozdział 4.5 - OSIĄGNIĘCIE nr II).

Ze względu na trudności w pozyskaniu odpowiedniej kohorty starych szczurów, w kolejnych etapach badań zdecydowano się na zmianę modelu zwierzęcego ze szczurzego na mysi. Wybór ten był podyktowany możliwością uzyskania większej liczby danych porównawczych, dzięki istnieniu m.in. rozbudowanych baz danych proteomicznych dotyczących myszy. Pozwoliło to, zarówno na bardziej precyzyjną interpretację własnych wyników, jak i na ich zestawienie z rezultatami innych grup badawczych (publikacje 2# – 4#).

W publikacji nr 2# opracowano szczegółowe bazy proteomiczne dla młodych oraz 12-miesięcznych myszy, natomiast w publikacjach nr 3# i 4# skupiono się na analizie zwierząt dwuletnich. W ramach tych pomiarów scharakteryzowano profile proteomiczne uzyskane z homogenatów hipokampu, kory i móżdżku. Opracowane bazy obejmowały **ponad 7000 wspólnych białek**, a zastosowanie metody TPA (z ang. *total protein approach* (Wiśniewski, 2016; Wiśniewski et al., 2014; Wiśniewski & Gaugaz, 2015)) umożliwiło uzyskanie ilościowych danych w wartościach wyrażonych jako **[*mol* białka / *g* białka całkowitego]**, co znacznie zwiększyło rzetelność późniejszych analiz porównawczych dla zwierząt pochodzących z różnych eksperymentów.

Wcześniejsze badania immunocytochemiczne i immunohistochemiczne innych grup badawczych, wykazały różnice w ekspresji białek między regionami mózgu i nawet typami neuronów, lecz były ograniczone do niewielkiej liczby białek i dawały jedynie dane półilościowe. Dlatego też **przygotowanie i analiza tak pełnej i ilościowej bazy danych proteomicznych, stanowi unikatowy wkład w rozwój dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych.**

W publikacji nr 2# skoncentrowano się na analizie hipokampu rocznych myszy. Dane proteomiczne wykazały wyraźne różnice w profilu białkowym pomiędzy zwierzętami młodymi a starszymi. Na szczególną uwagę zasługują obserwowane zmiany dla białek regulatorowych szlaków metabolicznych i białek transportujących metabolity energetyczne. I tak, u grupy myszy 12-miesięcznych m.in. zaobserwowano znaczący wzrost poziomu enzymów kluczowych dla szlaku glikolizy (heksokinazy 1 - *Hk1*, fosfofruktokinazy *Pfk* oraz kinazy pirogronowej *Pkm*), i towarzyszący im wzrost stężenia głównego transportera glukozy (Slca2a1). Zmiany te potwierdzono dodatkowymi metodami: barwieniami immunofluorescencyjnymi skrawków hipokampalnych oraz analizą ekspresji mRNA w wyizolowanych obszarach hipokampu (m.in. *stratum pyramidale*, rejonu zdominowanego przez ciała komórkowe neuronów). Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały na reorganizację metabolizmu w procesie starzenia, obejmującą dodatkowo wzrost stężenia m.in. fosforylazy glikogenowej, czy też enzymów związanych z metabolizmem glutaminianu (publikacja 2#).

Niniejsze obserwacje znalazły potwierdzenie i wręcz **pogłębiony obraz różnicujący profil metaboliczny pomiędzy zwierzętami różnych grup wiekowych**, zostały uzyskane dla myszy w wieku schyłkowym (22 miesięczne), które to stanowią wyselekcjonowaną kohortę obrazującą fizjologiczne starzenie się. W publikacjach nr 3# i 4# badania rozszerzono o analizę dodatkowych struktur mózgowych. Uzyskane wyniki wykazały istotne statystycznie zmiany nie tylko w hipokampie, lecz także w pozostałych analizowanych regionach mózgu starych myszy (w móżdżku i korze).

W publikacji nr 3# skupiono się na szlakach metabolicznych, takich jak glikoliza, rozkład i synteza glikogenu, szlak pentozofosforanowy (PPP), metabolizm mleczanu, pirogronianu, glutaminy i glutaminianu

oraz czółenko jabłczanowo-asparaginowe. Szczególną uwagę zwrócono również na przemiany kwasów tłuszczowych, białek związanych z β-oksydacją oraz cyklem kwasu cytrynowego (TCA) i fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS). W niniejszym artykule #przedstawiamy **najbardziej szczegółowy, jak dotąd, ilościowy opis proteomów metabolizmu energetycznego hipokampa, kory mózgowej i móżdżku u młodych i starych myszy**.

Z jednej strony, nasza analiza ujawniła istotne różnice w proteomach między trzema badanymi strukturami u zwierząt danej grupy wiekowej, co wskazuje na ich zróżnicowanie metaboliczne związane z ich zróżnicowaniem funkcjonalnym. Co więcej, co ważne, wykazaliśmy, że chociaż całkowita ekspresja białek (sumaryczne stężenie) w strukturach mózgu jest praktycznie niezmienna pod wpływem starzenia, **istnieją istotne różnice między młodymi i starymi myszami w ekspresji licznych białek zaangażowanych w metabolizm energetyczny**. Należy jednocześnie podkreślić, iż nie udało się wskazać jednego wspólnego schematu zmian w proteomie metabolizmu energetycznego na poziomie poszczególnych białek w trzech analizowanych strukturach. Można więc wnioskować, że każda z nich posiada odmienny potencjał adaptacyjny do ogólnych procesów towarzyszących starzeniu organizmu. Niemniej jednak zaobserwowano, że **proces starzenia wiąże się ze zwiększoną zdolnością wszystkich analizowanych struktur mózgu do utleniania glukozy w szlaku glikolitycznym**. Efekt ten przejawiał się jednak poprzez zmiany w poziomie nieco odmiennych zestawów białek regulatorowych w poszczególnych strukturach. Co istotne, wzrost aktywności glikolizy nie był związany ze zmianami w białkach metabolizmu mleczanu, lecz z podwyższonym stężeniem kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej. Enzym ten katalizuje przekształcenie produktu glikolizy: pirogronianu do acetylo-CoA, gdzie acetylo-CoA stanowi główny substrat mitochondrialnych szlaków energetycznych: cyklu kwasu cytrynowego (TCA) oraz fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS). Zauważyliśmy, że wyższa zdolność do wytwarzania acetylo-CoA z glukozy była skorelowana ze zwiększonym poziomem białek TCA i OXPHOS u starszych osobników. W przeciwieństwie do skoordynowanych zmian obserwowanych w szlaku glikolitycznym i TCA, ekspresja kompleksów OXPHOS wykazywała raczej niejednorodne, niespójne zmiany, co sugeruje zaburzenia regulacji tego szlaku.

Glikoliza może wspierać metabolizm oksydacyjny nie tylko poprzez dostarczanie pirogronianu, ale również dzięki NADH, który może być przenoszony do mitochondriów za pośrednictwem czółenka jabłczanowo-asparaginowego. Nasze analizy wykazały, że u starszych zwierząt stężenie większości składników tego mechanizmu było wyraźnie podwyższone, co podkreśla **rosnącą rolę glukozy jako głównego substratu do syntezy ATP w starzejącym się mózgu.**

Odwrotną tendencję zaobserwowaliśmy dla metabolizmu lipidów – w starszych mózgach poziomy białek wiążących kwasy tłuszczowe oraz enzymów β-oksydacji były znacząco obniżone, co wskazuje na **zmniejszoną zdolność do wykorzystywania kwasów tłuszczowych jako źródła energii**.

Dodatkowym źródłem metabolitów dla TCA i OXPHOS może być α-ketoglutaran powstający z glutaminianu lub glutaminy. Ustaliliśmy, że w starzejących się strukturach mózgu poziom dehydrogenazy glutaminianowej był wyższy, natomiast stężenia enzymu odpowiedzialnego za konwersję glutaminy do glutaminianu oraz białek transportujących glutaminian do mitochondriów nie zmieniały się wraz z wiekiem. Ponadto, nie zaobserwowaliśmy też istotnych różnic wieku w aktywności szlaku pentozofosforanowego.

Co ważne, w świetle całego projektu analizy działania ANLS, **odnotowaliśmy wyraźny wzrost poziomu białek związanych z degradacją glikogenu.** Wynik ten jest zgodny zarówno z naszymi wcześniejszymi badaniami proteomu hipokampa 12-miesięcznych myszy (publikacja 2#), jak i z hipotezą, **że**

zmiany w metabolizmie glikogenu mogą stanowić element reorganizacji metabolicznej komunikacji astrocyt–neuron związanej z wiekiem.

Aby uzupełnić obraz zmian na poziomie ekspresji białek, które towarzyszą procesom fizjologicznego starzenia się, w publikacji nr 4# koncentrowano się na białkach uczestniczących w regulacji plastyczności synaptycznej. Analizie poddano zarówno białka związane z główną transmisją pobudzającą (glutaminergiczną), główną transmisją hamującą (GABA-ergiczną) oraz z modulującymi transmisjami synaptycznymi (cholinergiczną i monoaminergiczną, czyli wspólną dla neuroprzekaźników jak: dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina, histamina). Ponadto porównano wybrane elementy wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, które są kluczowe dla plastyczności synaptycznej i tworzenia śladów pamięciowych (systemy regulacji poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia, białek sygnałowych zależnych od wapnia, kinazy zależne od cAMP, itd.).

Ponieważ homogenaty tkankowe hipokampu, kory i móżdżku zawierają zarówno neurony, jak i komórki glejowe, wyniki nie zawsze mogą być przypisane do jednego typu komórek. Jednak w niektórych przypadkach wiadomo, że dane białka są specyficzne, np. enzymy syntetyzujące GABA są charakterystyczne dla interneuronów.

Badania wykonano we wszystkich trzech analizowanych strukturach mózgowych, ujawniając różnice zależne od regionu. Co najistotniejsze, w hipokampie i korze starych zwierząt stwierdzono **spadek zawartości białek związanych z transmisją glutaminergiczną i GABA-ergiczną, co sugeruje obniżenie plastyczności neuronalnej**. Dodatkowo wykazano zmniejszenie poziomu kinazy *Camk4* (kinazy białkowej zależnej od Ca^{+2}/kalmodulin typu IV), odgrywającej kluczową rolę w konsolidacji pamięci długotrwałej (Wayman et al., 2008). Zaobserwowano również silny wzrost stężenia monoaminooksydazy (*Mao* - enzymu dezaktywującego monoaminamy) we wszystkich analizowanych strukturach, co sugeruje osłabienie sygnalizacji związanej z dopaminą, adrenaliną, noradrenaliną, histaminą czy serotoniną u starszych zwierząt (Riederer et al., 1987).

Z drugiej zaś strony, kluczowa dla mechanizmów plastyczności synaptycznej kinaza białkowa zależna od Ca^{+2}/kalmoduliny typu II (*Camk2*) (Chang et al., 2017), nie wykazywała zmian w stężeniu związanych z wiekiem, prawdopodobnie ze względu na wysoką obfitość i różnorodność funkcji, gdzie kluczowa jest jej aktywna forma (fosforylowana), nie zaś stężenie całkowite białka. Inne kinazy, takie jak *Pka* (kinaza białkowa A) czy *Mapk* (kinasa aktywowana mitogenem), także nie wykazywały wielu zmian, z wyjątkiem *Prkac* (podjednostki katalitycznej *Pka*), którego stężenie było obniżone w hipokampie, co sugeruje osłabienie transmisji pobudzającej (Chang et al., 2017).

W świetle zmian morfologicznych kolców dendrytycznych i obrazu histologicznego omawianych w publikacji #1, zwrócono szczególną uwagę na zmiany towarzyszące starzeniu, a które odzwierciedlają się w zmodyfikowanym profilu białkowym struktur bezpośrednio uczestniczących w budowie i reorganizacji synaps. Obejmowały one białka przestrzeni presynaptycznej (wydzielniczej), zewnątrzkomórkowej, oraz postsynaptycznej.

Zdolność do uwalniania neuroprzekaźników zależy od obecności białek uczestniczących w transporcie pęcherzyków synaptycznych. W naszych badaniach wykazaliśmy, że stężenie białek odpowiedzialnych za uwalnianie neuroprzekaźników, takich jak v-SNARE, t-SNARE, czy inne białka związane z egzocytozą, pozostawały stabilne wraz z wiekiem w hipokampie i móżdżku. Odmiennie w korze, poziom tych białek był znacząco wyższy u starszych zwierząt, co może wskazywać na większą liczbę aktywnych synaps w porównaniu z młodymi osobnikami. **Jednak ten wzrost po stronie presynaptycznej nie był**

skorelowany ze zwiększeniem poziomu białek postsynaptycznych odpowiedzialnych za odbiór i transmisję sygnału – ich zawartość w korze i hipokampie wręcz malała.

Ponieważ plastyczność synaptyczna zależy także od białek kształtujących morfologię synaps, zbadaliśmy stężenia białek adhezyjnych (z ang. *cell adhesion molecules,* CAMs) oraz białek macierzy zewnątrzkomórkowej tworzących sieci okołoneuronalne (z ang. *perineuronal nets* - PNNs) (Testa et al., 2019). **Większość CAMs obniżała się z wiekiem w hipokampie i korze**, natomiast w móżdżku pozostawała stabilna. Co ciekawe, białka z grupy *Lgi* (bogate w motywy powtórzeń leucynowych LGI, z ang. leucine-rich repeat LGI) oraz inne białka PNN (m.in. *Hapln* – białka łaczące hialuronian i proteoglikany; *Acan* - białko rdzeniowe agrekanu; *Bgn* - biglican) wykazywały istotny wzrost we wszystkich analizowanych strukturach. Wiadomo, że uczestniczą one w formowaniu i dojrzewaniu synaps oraz w procesach mielinizacji, co potwierdza większą liczbę dojrzałych i stabilnych synaps u starszych zwierząt (De Luca & Papa, 2016).

Nasze badania stanowią pierwszą kompleksową, ilościową analizę proteomiczną opisującą zmiany w stężeniu białek kluczowych dla transmisji sygnałów i plastyczności synaptycznej w hipokampie, korze i móżdżku, u młodych oraz starych myszy. Uzyskane dane ukazują wpływ fizjologicznego starzenia na plastyczność synaptyczną i mogą wskazywać potencjalne cele terapeutyczne w strategiach przeciwstarzeniowych. Wszystkie uzyskane bazy proteomiczne zostały zdeponowane w otwartym repozytorium, co umożliwia ich swobodne wykorzystanie w analizach porównawczych przez inne zespoły badawcze. Działanie to wpisuje się w zasady otwartej nauki, zapewniając transparentność i możliwość replikacji wyników (2#, 3#, 4#).

W drugiej fazie projektu uzyskaliśmy niepowtarzalną możliwość przetestowania i obserwacji wcześniej analizowanych różnic między zwierzętami młodymi a starymi, nie tylko na poziomie tkankowym i komórkowym, lecz także na poziomie całych organizmów (publikacje-7# i 8#). Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone przeze mnie w ramach zgody wydanej przez Wrocławską Komisję Etyczną (nr 10/2018 i nr 041/2023). Takie podejście umożliwiło uzyskanie znacznie szerszego obrazu procesów związanych z fizjologicznym starzeniem się oraz potwierdzenie zmian wcześniej wykazanych w bardziej izolowanych układach eksperymentalnych (publikacja 1# - 4#).

W publikacjach 7# i 8# opisaliśmy zmiany zdolności poznawczych ocenianych za pomocą testów behawioralnych (*in vivo*). Wyniki te potwierdziły obserwacje przedstawione w publikacji 1#, w której odpowiadające im zmiany zaobserwowano na poziomie plastyczności synaptycznej z wykorzystaniem pomiarów elektrofizjologicznych w izolowanych tkankach (*ex vivo*). Ponadto uzyskaliśmy powtarzalne dane dotyczące zmian metabolicznych, morfologii kolców dendrytycznych oraz profili proteomicznych u myszy, zgodne z wcześniej opisanymi wynikami uzyskanymi u szczurów.

Do badań włączono dwie grupy wiekowe: młode myszy w wieku 2 miesięcy oraz stare osobniki w wieku 20–22 miesięcy. Zwierzęta poddano serii testów behawioralnych, obejmujących:

- test rozpoznawania nowego obiektu (z ang. *Novel object recognition test*, NOR, z interwałem czasowym 6 h pomiędzy uczeniem a testem), oceniający pamięć długotrwałą z udziałem kory i hipokampa;
- test rozpoznawania nowego położenia obiektu (z ang. *Novel object location test*, NOL), badający głównie funkcję hipokampa;
- oraz test labiryntu Y, pozwalający na ocenę schematów eksploracji oraz porównanie zdolności spostrzegawczo-decyzyjnych;

- uzupełniająco przeprowadzono test preferencji sacharozy, wykorzystywany do oceny anhedonii;
- oraz test RotaRod, monitorujący sprawność motoryczną i funkcję móżdżku.

Równolegle rejestrowano parametry podstawowe, takie jak masa ciała, biochemia krwi obwodowej i ogólna kondycja fizyczna.

Wyniki wskazały, że **stare zwierzęta, mimo zachowanej prawidłowej kondycji fizycznej (potwierdzonej testami RotaRod, preferencją sacharozy, parametrami krwi, masą ciała oraz wynikami labiryntu Y), prezentowały istotne deficyty w testach poznawczych NOR i NOL w porównaniu z myszami młodymi.**

Analizy wykonane z wykorzystaniem tkanek pobranych po zakończeniu testów behawioralnych dostarczyły dodatkowych informacji. Uzyskane dane proteomiczne ujawniły wyraźne różnice pomiędzy grupami wiekowymi, wskazując m.in. na obniżoną ekspresję białek związanych z plastycznością synaptyczną i transmisją sygnałów u zwierząt starych. Równoległa analiza morfologii kolców dendrytycznych potwierdziła wcześniejsze obserwacje i wykazała wyraźne zmiany w strukturach hipokampu i korowych myszy związane ze starzeniem. U zwierząt starych stwierdzono przewagę dojrzałych form kolców dendrytycznych, odpowiadających stabilnym połączeniom neuronalnym, przy zachowanej gęstości ich tworzenia na powierzchni neuronów pobudzających, niezależnie od wieku. **Powtarzalność wyników, uzyskana w różnych modelach gatunkowych (myszy vs. szczury), dowodzi że obserwowane zmiany są przejawem fizjologicznego starzenia, a nie wynikiem indywidualnej zmienności.**

Aby pełniej zobrazować funkcje poznawcze powiązane z procesami starzenia się w określonych strukturach mózgowych, w dalszych testach behawioralnych wykorzystano odmienny schemat badawczy. W publikacji 8# zastosowano zmodyfikowany prorokół postepowania, łącząc testy NOR i NOL w krótkim oknie czasowym, z trzydziestominutowym odstępem między próbami. Takie podejście pozwoliło rozdzielić udział pamięci krótkotrwałej zależnej głównie od kory („short NOR"), od pamięci krótkotrwałej obrazującej głównie funkcję hipokampa („short NOL)"). Wyniki wskazały, że deficyty poznawcze u starych zwierząt dotyczyły przede wszystkim hipokampa: w krótkotrwałym teście NOR uzyskiwały one prawidłowe wyniki, natomiast w krótkotrwałym teście NOL wystąpiły istotne zaburzenia.

W ramach tego samego eksperymentu przeprowadzono również analizy metabolomiczne izolowanych tkanek zwierzęcych z zastosowaniem spektroskopii NMR. Profilowanie wykonano w hipokampie, korze i móżdżku, a globalna analiza statystyczna (PCA) wykazała wyraźne różnice pomiędzy próbkami analizowanych struktur mózgowych, co najwyraźniej odpowiada ich zróżnicowanym funkcjom. Łącznie zidentyfikowano 27 metabolitów, obejmujących związki związane z neurotransmisją, metabolizmem energetycznym, cyklem nukleotydów purynowych oraz metabolizmem lipidów, a także inne metabolity, takie jak kwas askorbinowy czy octan.

Analizy porównawcze wykazały, że starzenie prowadziło do spadku stężeń około 33% metabolitów w hipokampie, 26% w móżdżku i jedynie 4% w korze. Największe zmiany dotyczyły metabolizmu energetycznego, zwłaszcza szlaku *de novo* biosyntezy nukleotydów purynowych. Szczególnie w hipokampie stwierdzono znaczące obniżenie poziomów metabolitów związanych m.in. ze ścieżkami sygnałowymi (dla GABA, glutaminianu, glutaminy, asparaginanu i tauryny). Obserwowane przesunięcia metaboliczne najprawdopodobniej odzwierciedlają zaburzoną homeostazę mózgu, co przekłada się na zmniejszoną aktywność neuronalną, ograniczoną plastyczność i pogorszenie funkcji poznawczych. Ważne jest, że **zmiany w metabolomie hipokampa były zgodne z negatywnymi wynikami testu NOL w zwierząt starych,** co dodatkowo potwierdza ich znaczenie funkcjonalne. Jednocześnie, niewielkie zmiany w

profilu metabolicznym dla struktur korowych (jedyne 4%) mogą tłumaczyć obserwowaną pozytywna odpowiedź w teście behawioralnym pamięci krótkotrwałej związanej z tą strukturą (w teście NOR).

Odrębny aspekt wyników dotyczył metabolizmu lipidów, którego ujemne zmiany były szczególnie wyraźne w hipokampie i móżdżku. I tak dla przykładu, znaczący spadek stężenia O-fosfocholiny (Chop) i O-fosfoetanolaminy (PEA) obserwowany w starzejącym się hipokampie. Metabolity te biorą udział w obrocie fosfolipidów i służą jako prekursory do biosyntezy fosfatydylocholiny, niezbędnego związku lipidowego w błonach komórkowych (Paoletti et al., 2011). Ponadto obniżony poziom PEA koreluje z utratą neuronów i jest powszechnie obserwowany w chorobie Alzheimera i Huntingtona (Ellison et al., 1987). Lipidy, stanowiące drugą co do wielkości klasę biomolekuł zaangażowanych w procesy starzenia, istotnie wpływają na metabolizm komórkowy. **Dlatego też, uzyskane dane stały się podstawą do podjęcia nowych kierunków badawczych, obejmujących szczegółowe analizy lipidomiczne tkanki nerwowej, które są obecnie w toku.**

4.4.1. Podsumowanie OSIĄGNIĘCIE nr I

Podsumowując OSIĄGNIĘCIE nr I, w których porównano młode i stare zwierzęta, uzyskaliśmy złożony obraz procesów związanych z fizjologicznym starzeniem się. Zmiany te obejmowały wiele poziomów – od molekularnego, przez tkankowy, aż po behawioralny. Wyniki jednoznacznie wskazują, że w procesie starzenia część mechanizmów pozostaje zachowana na względnie stałym poziomie. Jednak te elementy, które bezpośrednio wpływają na zdolności poznawcze, ulegają deregulacji. Odnosi się to zarówno do **zmian w ekspresji białek**, jak i do późniejszych **efektów komórkowych**, widocznych w postaci **modyfikacji stężeń metabolitów**. Zmiany te wskazują na **zaburzenia w aktywności enzymów oraz w funkcjonowaniu szlaków sygnałowych w starzejących się komórkach tkanki nerwowej**, co w rezultacie prowadzi do **dysfunkcji poznawczych.** Należy zauważyć, iż w przeprowadzonych przez nas eksperymentach, **największe zmiany odnotowano w funkcjonowaniu hipokampa**, natomiast słabiej były one widoczne w procesach poznawczych zależnych od kory mózgowej i móżdżku.

Uzyskany szeroki obraz **fizjologicznego procesu starzenia się (OSIĄGNIĘCIE nr I)** stanowi solidną podstawę do podjęcia dyskusji nad wynikami kolejnego etapu badań, w których skupiono się na analizie zwierząt, poddanych działaniu inhibitora fosforylazy glikogenowej (BAY U6751) (omówione szczegółowo w **Rozdziale 4.5, jako OSIĄGNIĘCIE nr II**). Zastosowanie tego drobnocząsteczkowego inhibitora, blokującego rozkład glikogenu, pozwoliło wyłączyć szlak degradacji magazynu energetycznego w komórkach, a tym samym wywołać zmiany metaboliczne zarówno w młodych, jak i starych organizmach. Otrzymane wyniki ujawniły, że efekt działania inhibitora był wyraźnie odmienny w zależności od wieku zwierząt, co wskazuje na fundamentalne różnice w metabolizmie komórkowym pomiędzy organizmami młodymi a starymi.

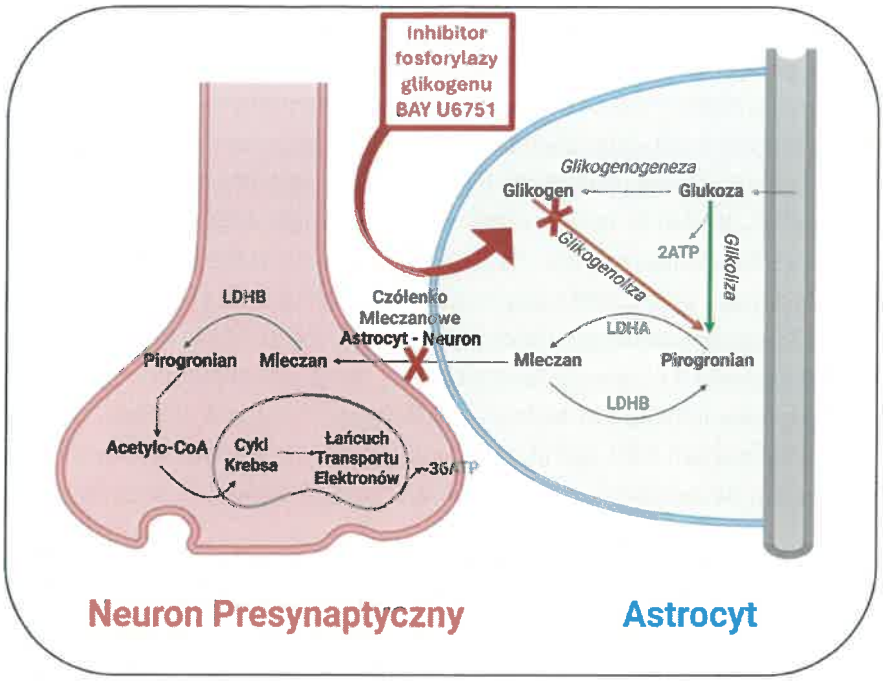
Zastosowane podejście eksperymentalne umożliwiło **weryfikację hipotezy dotyczącej działania tzw. czółenka mleczanowego (ANLS)**, które – jak omówiono we wstępie do omawianej tu części projektu – jest postulowane jako kluczowy mechanizm współpracy metabolicznej pomiędzy astrocytami a neuronami. Pierwsze osiągnięcie badawcze (**Rozdział 4.4: OSIĄGNIĘCIE nr I**) **dostarczyło danych porównawczych dla młodych i starych zwierząt w warunkach fizjologicznego starzenia**, natomiast drugie (**Rozdział 4.5: OSIĄGNIĘCIE nr II**) – dzięki użyciu inhibitora fosforylazy glikogenu – **pozwala na analizę i pogłębione zrozumienie mechanizmów regulujących plastyczność synaptyczną w starzeniu się, a otrzymane wyniki dają nadzieję na pozyskanie uniwersalnego leku na obserwowane dysfunkcje poznawcze.**

4.5. OSIĄGNIĘCIE nr II – ANALIZA PLASTYCZNOŚ SYNAPTYCZNEJ ORAZ ZDOLNOŚCI KOGNITYWNYCH ZWIERZĄT W RÓŻNYM WIEKU W ZALEŻNOŚCI OD DOSTĘPNOŚCI GLIKOGENU JAKO ŹRÓDŁA ENERGII.

Uważa się, że upośledzona plastyczność synaptyczna jest jednym z głównych mechanizmów leżących u podstaw zależnego od wieku pogorszenia funkcji poznawczych (Rosenzweig & Barnes, 2003). Większość pobudzenia w mózgu jest przekazywana przez kanały bramkowane glutaminianem i powszechnie przyjmuje się, że zmniejszona liczba, niedostateczny transport i/lub upośledzenie czynnościowe tych receptorów (zwłaszcza typu AMPA) przyczyniają się do związanego z wiekiem spadku plastyczności (Henley & Wilkinson, 2013). Ponadto wiadomo, że zjawiska plastyczności synaptycznej objawiają się również głębokimi zmianami kształtu kolców dendrytycznych (Bourne & Harris, 2011; Petralia et al., 2014), jednak wciąż niewiele wiadomo o tym, w jaki sposób wraz z wiekiem zmienia się podatność tych struktur na modyfikacje morfologiczne.

W ciągu ostatniej dekady zgromadzono coraz więcej dowodów na to, że astrocyty regulują właściwości sieci neuronowych m.in. poprzez dostarczanie prekursorów neuroprzekaźników i modulację sygnalizacji neuronalnej, np. poprzez uwalnianie szerokiego spektrum glioprzekaźników (Parpura & Zorec, 2010). Około 25 lat temu wykazano również, że metabolizm energetyczny astrocytów odgrywa kluczową rolę w regulacji transmisji synaptycznej i zjawisk plastyczności w sieciach neuronowych: hamowanie rozpadu glikogenu i uwalniania mleczanu z astrocytów zmniejsza miniaturowe pobudzające prądy postsynaptyczne w kulturach astrocytów i neuronów (Mozrzymas et al., 2011), hamuje konsolidację pamięci u kurcząt (Gibbs, Anderson, et al., 2006) oraz zakłóca formowanie pamięci w hipokampie myszy (Suzuki et al., 2011). Należy jednak podkreślić, że eksperymenty behawioralne (Gibbs, Anderson, et al., 2006; Gibbs, O'dowd, et al., 2006; Suzuki et al., 2011) prowadzono jedynie na zwierzętach młodych lub młodocianych. Dokładny mechanizm współdziałania astrocytów i neuronów w procesach warunkujących tworzenie śladów pamięciowych i zapamiętywanie, wciąż jest jednak zagadką. Zważywszy na obserwacje opisane w literaturze światowej oraz wstępne wyniki własne, podjęto w grupie prof. Dariusza Rakusa badania, które wypełniły istotną lukę w zrozumieniu zależności między starzeniem, plastycznością synaptyczną a astrocytarno-neuronalną kooperacją metaboliczną. W ten sposób powstał **projekt łączący wiedzę z zakresu metabolizmu komórkowego z zagadnieniami neurobiologii,** którego celem było (i nadal jest) **zdobycie wiedzy na temat ww. korelacji u zwierząt w różnym wieku.** Jako główny wykonawca dwóch grantów poświęconych ściśle tej tematyce, otrzymane wyniki opisuję jako moje **OSIĄGNIĘCIE nr II.**

W projekcie skoncentrowaliśmy się na badaniu procesów metabolicznych w kontekście plastyczności synaptycznej i funkcji poznawczych podczas starzenia. Punktem wyjścia były wyniki uzyskane w ramach **Osiągnięcia nr I**, gdzie porównano procesy zachodzące w młodych i starych organizmach (tu traktowane jako grupy kontrolne). W **Osiągnięciu nr II** rozszerzyliśmy te analizy, skupiając się na funkcjonowaniu czółenka astrocytarno–neuronowego (z ang. *astrocyte–neuron lactate shuttle*, ANLS). **Schemat ANLS oraz jego farmakologiczne zaburzenie, poprzez zahamowanie fosforolizy glikogenu** (poprzez użycie drobnocząsteczkowego inhibitora fosforylazy glikogenowej BAY U6751) **stanowił podstawę interpretacyjną przeprowadzonych badań dla OSIĄGNIECIA nr II (Rycina 2).**



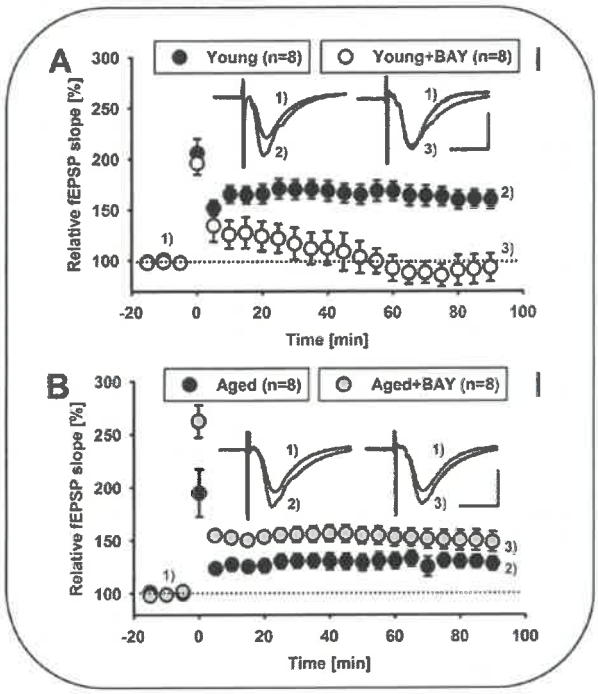
Rycina 2. Schemat przepływu substratów energetycznych w teorii astrocytarno-neuronalnego czółenka mleczanowego (z ang. astrocyte–neuron lactate shuttle, ANLS). Kolorem bordowym oznaczono stosowany w eksperymentach czynnik farmakologiczny - inhibitor fosforylazy glikogenowej BAY U6751 (BAY). Zastosowanie BAY hamuje rozkład glikogenu i tym samym zaburza mechanizm ANLS. Legenda: LDHA (dehydrogenaza mleczanowa typu A); LDHB (dehydrogenaza mleczanowa typu B).

We wszystkich eksperymentach zaliczonych do OSIĄGNIĘCIA nr II, zastosowano drobnocząsteczkowy inhibitor BAY U6751 (BAY) oddziałujący specyficznie z fosforylazą glikogenową (Bergans et al., 2000). W ten sposób wymuszono zmiany w metabolizmie komórkowym, a następnie przeprowadzono ocenę parametrów, które okazały się być wrażliwe na ograniczenie dostępu glikogenu, tudzież wrażliwe na zaburzenie układu ANLS. Scharakteryzowano:

- **plastyczność synaptyczną** (publikacje 1#, 4#, 7#, 8#));
- **morfologię kolców dendrytycznych** (publikacje 1#, 7#);
- **ekspresję białek zaangażowanych w metabolizm energetyczny** (publikacje 1#, ,2#, 3#, 8#);
- **profile proteomiczne** (publikacje 2#, 3#, 4#, 6# 7#);
- **profile metabolomiczne** (publikacja 8#);
- oraz określono **funkcje poznawcze zwierząt w różnym wieku** (młode vs. stare; publikacje 6#, 7#, 8#).

Rozpoczynając pracę nad wyznaczonym modelem badawczym (Rycina 2) w pierwszej kolejności wykonano eksperymenty elektrofizjologiczne na izolowanych skrawkach hipokampalnych pozyskiwanych z zwierząt w różnym wieku (1#). Na wstępie konieczne było ustalenie zakresu stężeń prowadzących do tworzenia kompleksu inhibitor–fosforylaza glikogenowa (dane te zostały opublikowane w materiałach uzupełniających do 1# i 7#), które pozwoliły na efektywne wywołanie dysfunkcji ANLS, przy zachowanym ogólnym dobrostanie tkanki nerwowej (później zaś przy zachowanym dobrostanie zwierząt traktowanych inhibitorem w administracji dootrzewnowej).

Pomiary elektrofizjologiczne (publikacja 1#) wykazały, że w hipokampie młodych zwierząt zahamowanie fosforolizy glikogenowej, przy użyciu 5 µM inhibitora BAY U6751, zakłóca późną fazę długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (z ang. *Long-term potentiation*, LTP) w projekcji koraterale Schaffera–CA1 (projekcja koraterale Schaffera–CA1 to najlepiej opisany model dla badania plastyczności synaptycznej pobudzającej w pomiarach elektrofizjologicznych (Kumar, 2011; Sun et al., 2018) (Rycina 1 oraz Rycina 3A). Wyniki te były dowodem na poprawność schematu pomiarowego, w którym byliśmy w stanie replikować mechanizmy ANLS opisane dla innych schematów badawczych z udziałem kurcząt (Gibbs, Anderson, et al., 2006) oraz myszy (Suzuki et al., 2011). W badaniach Gibbs i Suzuki analizowano ANLS z użyciem zwierząt, którym podawano inhibitor DAB w bezpośredniej, domózgowej iniekcji (DAB, 1,4-dideoksy-1,4-imino-D-Arabinitol, jest mniej specyficznym i odmiennym chemicznie oraz farmakokinetycznie inhibitorem fosforylazy glikogenu (Gregus & Németi, 2007)). Tym samym udowodniono, że mechanizm ANLS jest niezbędny do poprawnej plastyczności synaptycznej w pomiarach z zastosowaniem skrawków hipokampalnych izolowanych z młodych szczurów.



Rycina 3. Pomiary elektrofizjologiczne indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (*long-term potentiation*, LTP) na skrawkach hipokampalnych szczura. Odpowiedzi synaptyczne indukowane stymulacją wysokoczęstotliwościową (HFS), przedstawione jako procent zmian nachylenia fEPSP (z ang. *relative fEPSP slope*) względem transmisji synaptycznej w warunkach stymulacji bazowej (przeliczone jako bazowe 100%) w funkcji czasu (*Time*). Dane uzyskane ze skrawków hipokampalnych w projekcji kolaterale Schaffera–CA1. (A) U młodych zwierząt (1-miesięcznych) zastosowanie inhibitora degradacji glikogenu (BAY) znosiło plastyczność synaptyczną, uniemożliwiając powstanie stabilnego LTP (brak długotrwałego wzmocnienia sygnału EPSP - powrót do linii bazowej) (B) U zwierząt starych (2-letnich) inhibitor BAY nasilał efekty HFS względem grupy kontrolnej, co wskazuje na zwiększoną plastyczność synaptyczną indukowaną elektrofizjologicznie (znacząco statystycznie wzrost EPSP i stabilne utrzymanie potencjacji w długim oknie czasowym). (Dane opracowano na podstawie publikacji 1#).

Ku naszemu zaskoczeniu, zaobserwowaliśmy odmienny efekt BAY na skrawkach hipokampalnych izolowanych ze zwierząt starych, gdzie blokada fosforylazy glikogenowej prowadziła do zwiększenia amplitudy postsynaptycznych potencjałów pobudzających (z ang. *excitatory postsynaptic potential*, EPSP) i utrzymania LTP nawet w późnej fazie pomiarów elektrofizjologicznych (Rycina 3B). Ponadto analiza krótkoterminowej plastyczności synaptycznej (wyrażana m.in. w parametrach sparowanych potencjałów post synaptycznych; z ang. *paired-pulse facilitation*, PPF), wykazała brak wpływu BAY na mechanizmy presynaptyczne u młodych zwierząt, natomiast w grupie starszej traktowanej BAY, PPF było pozytywnie nasilone. Otrzymane wyniki sugerują, że zróżnicowane działanie BAY na LTP może obejmować zarówno mechanizmy post-, jak i presynaptyczne. Co istotne, obecności inhibitora BAY nie wpływała na bazowe parametry aktywności tkanki nerwowej niezależnie od wieku zwierząt. Tym samym wnioskujemy, iż **efekty farmakologiczne były zatem ograniczone do mechanizmów plastyczności, gdzie tkanka nerwowa była poddawana wzmożonej aktywności transmisji synaptycznej**.

Zaobserwowano ponadto, iż różnice odpowiedzi elektrofizjologicznej skrawków hipokampalnych były powiązane z odmiennym sposobem dojrzewania kolców dendrytycznych w obu grupach wiekowych. **Łącznie nasze wyniki dostarczyły pierwszych dowodów na to, że metabolizm glikogenu w astrocytach moduluję plastyczność synaptyczną w sposób zależny od wieku.** Mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska obejmują zmiany w ekspresji genów enzymów kluczowych dla metabolizmu energetycznego (*Gys1, Pygb, Glns*), różnice w odpowiedzi morfologicznej kolców dendrytycznych oraz **wiekowo zróżnicowaną wrażliwość na farmakologiczną blokadę glikogenolizy**. Otrzymane wyniki sugerowały, że zmiany molekularne w metabolizmie energetycznym astrocytów poprzedzają zjawiska plastyczności synaptycznej i mogą stanowić jeden z kluczowych czynników warunkujących zdolności poznawcze w procesie starzenia. Wyniki te otworzyły nową perspektywę badań nad mechanizmami zapobiegania pogorszeniu funkcji poznawczych związanych z wiekiem (2# - 8#).

Na podstawie wstępnych wyników aktywności inhibitora BAY w układzie *ex vivo* (1#), postanowiliśmy przetestować otrzymane optymistyczne dane wpływu BAY na zwierzętach starych w układzie *in vivo* (6# - 8#). Aby móc analizować efekty BAY, należało wpierw udowodnić, iż jest on w stanie efektywnie przekraczać barierę krew-mózg i tam wchodzić w kompleks z fosforylazą glikogenu. W tym cel **przeprosiliśmy jako pierwsi pomiar stężenia BAY w wybranych tkankach pobranych od zwierząt** (5#). Pomiar wykonano w oknie czasowym odpowiadającym zaplanowanym na przyszłość eksperymentom behawioralnym, gdzie pomiędzy iniekcją dootrzewnową a testem behawioralnych zaplanowano 6 godzin przerwy. W pomiarach LC-MS uzyskaliśmy powtarzalne i znaczące stężenia inhibitora w wybranych tkankach pobranych z myszy traktowanych BAY (t = 6 h). Co najistotniejsze z punktu widzenia przyszłych eksperymentów, inhibitor BAY był obecny nie tylko w tankach obwodowych (wątrobie, sercu i mięśniach szkieletowych, czyli w tkankach o naturalnie wysokim stężeniu fosforylazy glikogenowej), ale również w hipokampie, korze i móżdżku. Stężenie BAY w strukturach mózgowych było na poziomie gwarantującym efektywne tworzenie kompleksu enzym – inhibitor (Bergans et al., 2000; Gregus & Németi, 2007). Tym samym **przetestowano i ustalono warunki stężeń minimalnych inhibitora BAY, warunkujących uzyskanie efektu tkankowego (1#) i stężeń gwarantujących efekty w całym organizmie myszy, w tym w mózgu** (5#).

Mając na uwadze obiecujące wyniki z publikacji 1#, zaplanowano analizy monitorujące efekty długotrwałego hamowania rozkładu glikogenu (przy 14 dniowej administracji dootrzewnowej BAY - 7#) oraz przy jednorazowej dawce inhibitora (8#) w administracji dootrzewnowej. Otrzymano dane dla dwóch grup wiekowych: dla osobników młodych (2 miesięcznych myszy) oraz dla osobników starych (myszy 20-22 miesięczne). Wyniki prezentowane w publikacjach 7# i 8# **dają niezbite dowody na to, że zahamowanie rozkładu glikogenu, a tym samym zaburzenie mechanizmów postulowanego czółenka ANLS, ma diametralnie różny efekt u organizmów młodych i starych.**

W schemacie długotrwałej administracji BAY (7#), jak już opisano przy **OSIAGNIECIU nr I** cyt:, „zwierzęta poddano zestawowi testów behawioralnych, obejmujących test rozpoznawania nowego obiektu (z ang. Novel object recognition test, NOR, z interwałem czasowym 6h pomiędzy uczeniem a testem), oceniający pamięć długotrwałą z udziałem kory i hipokampa, test rozpoznawania nowego położenia obiektu (z ang. *Novel object location test*, NOL), badający głównie funkcję hipokampa, oraz test labiryntu Y, pozwalający na ocenę schematów eksploracji oraz porównanie zdolności spostrzegawczo-decyzyjnych pomiędzy grupami. Uzupełniająco przeprowadzono test preferencji sacharozy, wykorzystywany do oceny anhedonii, oraz test RotaRod, monitorujący sprawność motoryczną i funkcję móżdżku. Równolegle rejestrowano parametry podstawowe, takie jak masa ciała, biochemia krwi obwodowej i ogólna kondycja fizyczna."

U młodych myszy, dwutygodniowe podawanie BAY nie wpływało na podstawowe parametry fizjologiczne, takie jak masa ciała, poziom glukozy w surowicy czy koordynacja ruchowa. Zauważono jednak niewielki, ale istotny statystycznie spadek spożycia sacharozy, sugerujący zachowanie typu anhedonii, potencjalnie związane z zaburzeniami w układach mezokortykalno-limbicznych (Campbell & MacQueen, 2004). Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami, że blokada glikogenolizy upośledza pamięć hipokampalną (Gibbs, O'dowd, et al., 2006; Suzuki et al., 2011; Vezzoli et al., 2020) również w naszych eksperymentach BAY wpływał negatywnie na niektóre parametry charakteryzujące zdolności kognitywne np. wydłużył czas podjęcia pierwszej eksploracji w teście NOR (Rycina 5C). Dodatkowo analiza kolców dendrytycznych u myszy młodych wykazała zmniejszoną gęstość (Rycina 6C) i statystyczne skrócenie długości rejestrowanych struktur postsynaptycznych w hipokampie, co bezpośrednio koreluje ze spadkiem plastyczności i zaburzeniami orientacji przestrzennej (Krzystyniak et al., 2019). Co istotne, administracja BAY nie miała takich negatywnych efektów prezentowanych w kolcach dendrytycznych struktur korowych młodych zwierząt, co dodatkowo skłania do wniosków, iż to właśnie hipokamp jest najbardziej narażony na deregulacje wiązane z zaburzeniami metabolicznymi ANLS. Dodatkowo analiza proteomiczna wykazała, że długotrwałe podawanie BAY zmienia stężenia setek białek w hipokampie. Remodelling proteomiczny u młodych zwierząt obrazował globalne przesunięcie proteomu w kierunku obniżonej plastyczności, zgodnie z obserwacjami behawioralnymi i morfologicznymi.

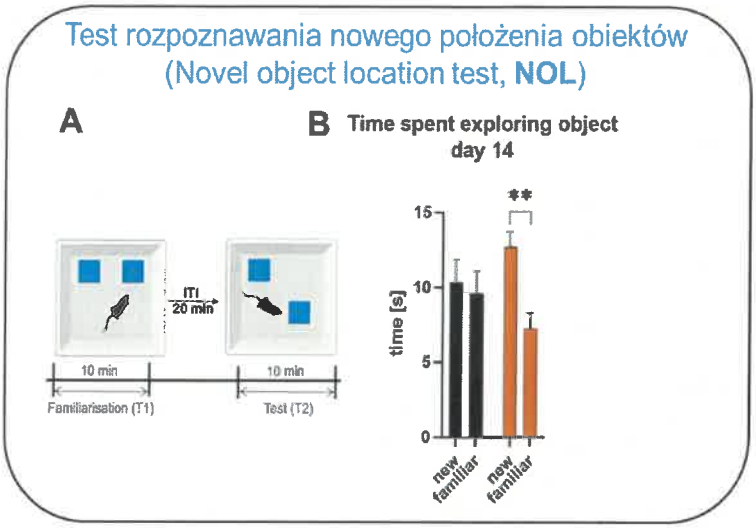
Ale najważniejszym i najcenniejszy osiągnieciem całego projektu są niewątpliwie odkrycia dotyczące wpływu BAY na osobniki starych myszy. Tu długoterminowa administracja BAY miała zadziwiająco pozytywny wpływ na wszystkie analizowane parametry w grupie starych myszy traktowanych BAY w porównaniu do zwierząt kontrolnych (7#):

- Na poziomie behawioralnym BAY wyraźnie poprawiał funkcje poznawcze u starszych zwierząt, co obrazują: pozytywne wyniki w teście NOL (Rycina 4); pozytywne wyniki w teście NOR (Rycina 5A-B); skrócenie czasu pierwszej eksploracji w teście NOR (Rycina 5C); zachowanie pozytywne w teście preferencji sacharozy (7#) oraz brak zmian w teście RotaRod (7#);

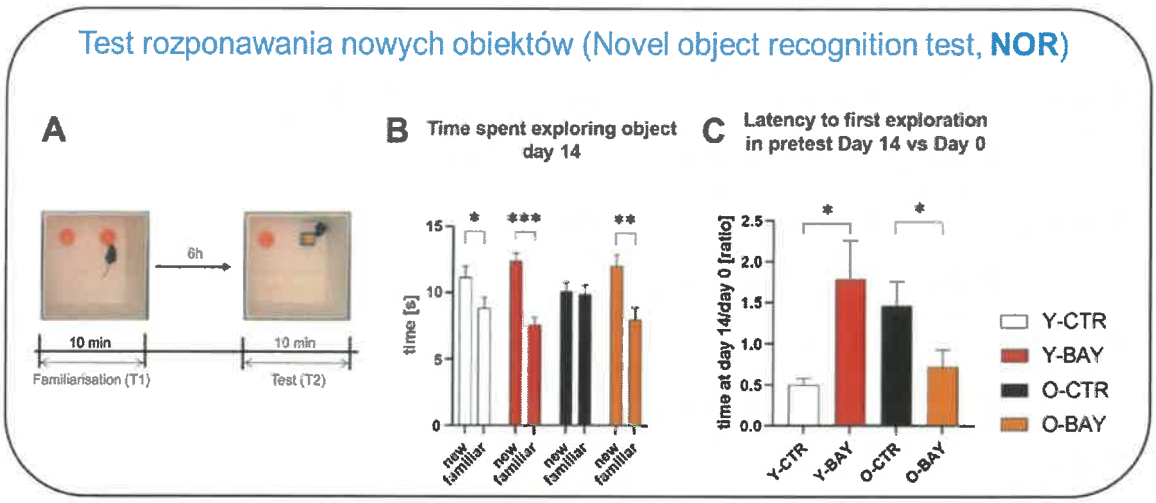
- Na poziomie fizjologicznym BAY nie wpływał na podstawowe parametry takie jak: masa ciała, poziom glukozy w surowicy czy koordynacja ruchowa, a wręcz zaobserwowano zwiększoną pielęgnację (z ang. *grooming*) (7#);

- Na poziomie morfologicznym u zwierząt traktowanych BAY populacja kolców dendrytycznych hipokampu została statystycznie przesunięta ze stabilnych, grzybkowatych do cienkich i filopodialnych, przez co został odzyskany profil charakterystyczny dla młodych zwierząt i wskazuje to na odzyskaną wysoką plastyczność w neuronach pobudzających (Rycina 6A vs. 6B) (Basu et al., 2016; Toni et al., 2007). Gęstość kolców dendrytycznych pozostała bez zmian (Rycina 6C). Jednocześnie w strukturze korowej nie stwierdzono istotnych różnic (7#), dlatego też otrzymane dane wskazują, że metabolizm glikogenu astrocytów i szlak ANLS odgrywają kluczową rolę w hipokampie, a w korze pełnią funkcję prawdopodobnie jedynie wspomagającą (Voutsinos-Porche et al., 2003).

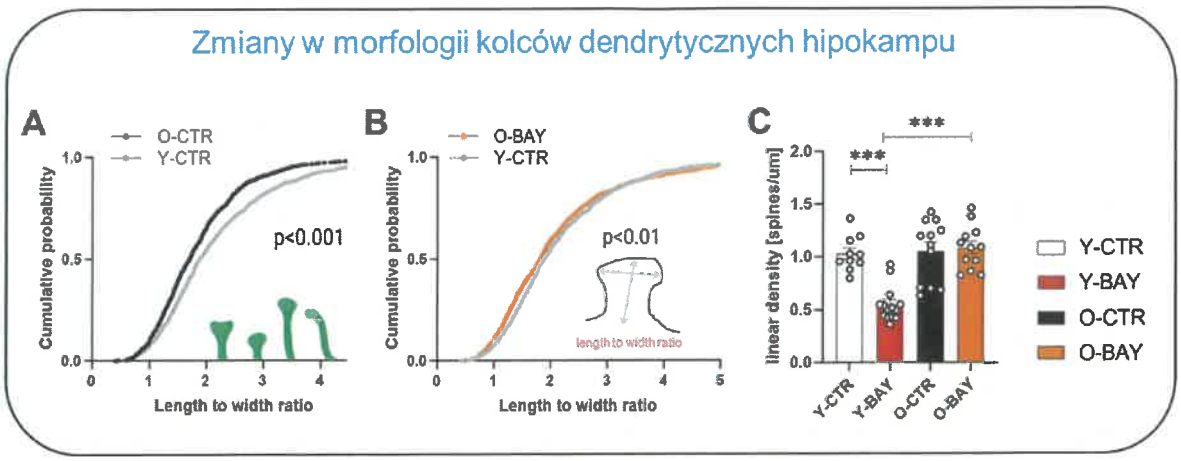
- Na poziomie komórkowym, analiza proteomiczna wykazała, że długotrwałe podawanie BAY u starszych myszy indukowało globalną „odmładzającą" zmianę proteomu hipokampu (6#, 7#), odwracając wiekowo-zależną deregulację białek związanych m.in. z translacją, rozwojem układu nerwowego, transportem białek, adhezją, migracją oraz neurotransmisją (Rycina 7).



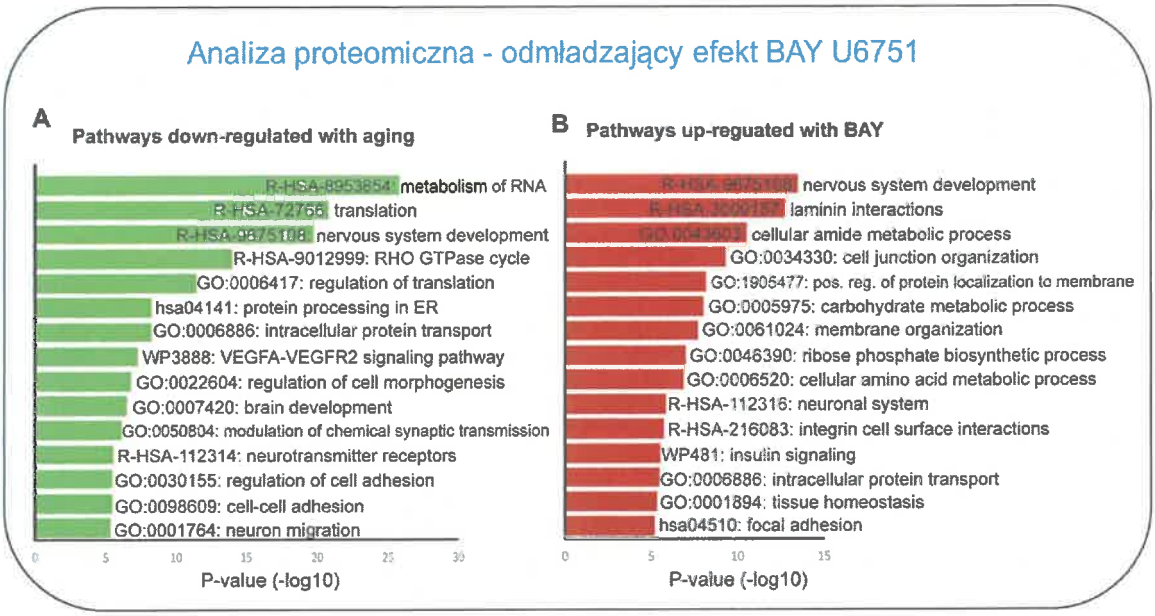
Rycina 4. Długofalowe hamowanie fosforylazy glikogenowej stymuluje tworzenie pamięci zależnej od hipokampu u myszy w wieku od 20 do 22 miesięcy. (A) Schematyczne przedstawienie eksperymentu testu rozpoznawania położenia obiektów (*Novel object location test*, NOL). B) Czas eksploracji obiektów podczas sesji testowej NOL przeprowadzonej po 14 dawkach BAY U6751 (*time spent exploring object*). Wydłużenie czasu eksploracji obiektu w nowej lokalizacji (*new*) względem znanej lokalizacji obiektu (*familiar*) wskazuje na pozytywne zdolności kognitywne. Liczba badanych w każdej grupie eksperymentalnej n = 9. Wskazano statystycznie istotne zmiany między grupami (**p < 0,01). Legenda: O-CTR – osobniki stare kontrolne; O-BAY - osobniki stare traktowane inhibitorem BAY U6751. (Dane opracowano na podstawie publikacji 7#)



Rycina 5. Długofalowe hamowanie fosforylazy glikogenowej stymuluje tworzenie pamięci długotrwałej u myszy w wieku 20-22 miesięcy. (A) Schematyczne przedstawienie eksperymentu testu rozpoznawania nowych obiektów (*Novel object recognition test*, NOR). (B) Czas eksploracji obiektów podczas sesji testowej NOR przeprowadzonej po 14 dawkach BAY U6751 (*time spent exploring objects*). Wydłużenie czasu eksploracji nowego obiektu (*new*) względem znanego (*familiar*) wskazuje na pozytywne zdolności kognitywne. (C) Stosunek czasu latencji do pierwszej eksploracji między 14 dniem a dniem zero, jako wskaźnik tworzenia pamięci związany z plastycznością hipokampa. Skrócenie czasu podjęcia pierwszej eksploracji wskazuje na zwiększenie orientacji przestrzennej u myszy starych. Liczba badanych w każdej grupie eksperymentalnej n = 9. Wskazano statystycznie istotne zmiany między grupami (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001). Legenda: Y-CTR – osobniki młode kontrolne; Y-BAY – osobniki młode traktowane inhibitorem BAY U6751, O-CTR – osobniki stare kontrolne; O-BAY - osobniki stare traktowane inhibitorem BAY U6751. (Dane opracowano na podstawie publikacji 7#)



Rycina 6 Inhibitor fosforylazy glikogenu BAY U6751 wpływa na morfologię kolców dendrytycznych w hipokampie starych zwierząt. (A-B) Dystrybucja parametru kształtu kolców dendrytycznych (stosunek długości do szerokości, zastosowano test Kołmogorowa–Smirnowa). Obserwowane różnice pomiędzy grupami kontrolnymi osobników w różnym wieku (A), zanikają przy porównaniu grupy starych osobników traktowanych BAY (B) – „efekt odmłodzenia". (C) Gęstość liniowa kolców w neuronach hipokampa wskazuje na neutralny wpływ BAY u zwierząt starych i negatywny u zwierzat mlodych (zastosowano test t-Studenta). Liczba osobników w każdej grupie eksperymentalnej: zwierzęta (n = 4–5), liczba analizowanych komórek na zwierzę (n = 9–14) i liczba kolców analizowanych w grupie (n = 1100–1250). *** p < 0,001. Legenda: Y-CTR – osobniki młode kontrolne; Y-BAY – osobniki młode traktowane inhibitorem BAY U6751, O-CTR – osobniki stare kontrolne; O-BAY - osobniki stare traktowane inhibitorem BAY U6751. (Dane opracowano na podstawie publikacji 7#).



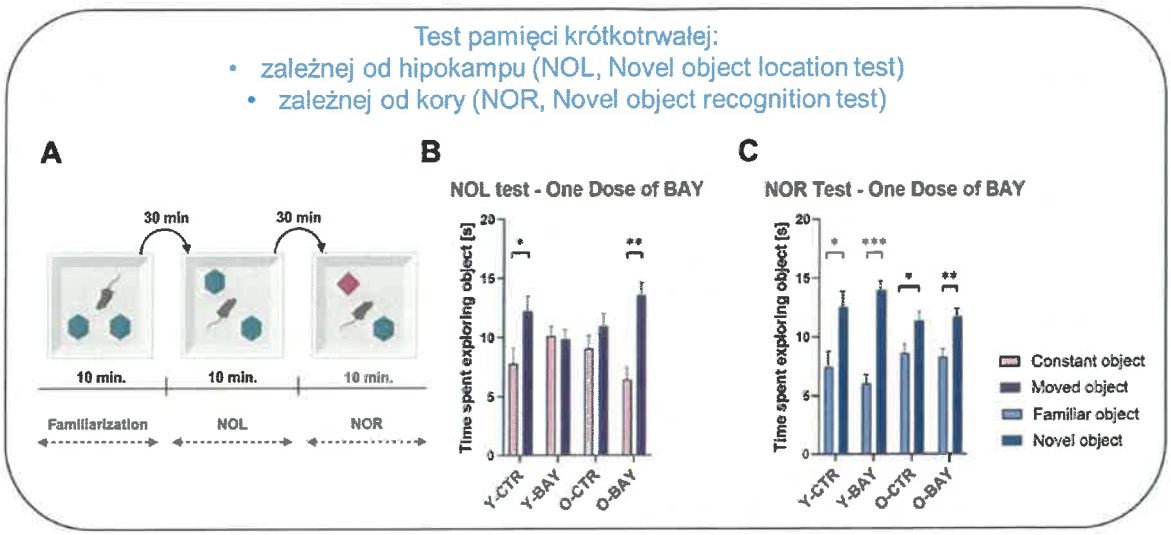
Rycina 7. Analiza bazy proteimicznej dla biopsji hipokampalnych (A) białek, których ekspresja maleje wraz z wiekiem (O-CTR vs. Y-CTR) oraz (B) białek, których ekspresja wzrasta po zastosowaniu BAY u starych myszy (O-BAY vs. O-CTR). Wartości istotności statystycznej *„p"* dla wzbogacenia wygenerowano za pomocą Metascape przy użyciu kumulatywnych rozkładów hipergeometrycznych. GO — Gene Ontology, R-HSA — Reactome pathway database, WP — WikiPathways. Zastosowane skróty: Y-CTR – osobniki młode kontrolne; O-CTR – osobniki stare kontrolne; O-BAY - osobniki stare traktowane inhibitorem BAY U6751. (Dane opracowano na podstawie publikacji 7#).

Zwierzęta uczestniczące w testach behawioralnych zostały przeznaczone na preparaty do pośmiertnych analiz, m.in. do oznaczeń tkankowych oraz analiz omicznych. Dane proteomiczne uzyskaliśmy dla czterech grup zwierząt: **młodych kontroli (Y-CTR) młodych traktowanych inhibitorem (Y-BAY), starych kontroli (O-CTR) oraz starych traktowanych inhibitorem (O-BAY),** gdzie dla każdej z grup scharakteryzowano trzy niezależne struktur mózgowe zaangażowane w procesy pamięciowe: **hipokamp, korę i móżdżek.** Dzięki tak dużej bazie danych, możemy porównywać między grupami **ponad 7000 oznaczonych ilościowo białek** pod różnym kątem: **(1)** zarówno ze względu na efekty fizjologicznego starzenia się, **(2)** na efekty różniące pomiędzy strukturami, **(3)** jak i na różnice obserwowane u organizmów młodych i starych poddanych swego rodzaju restrykcji „energetycznej", czyli w których farmakologicznie hamowaliśmy rozkład glikogenu (przez zastosowanie inhibitora BAY U6751).

Dla przykładu, w publikacji 7# przedstawiono wstępną analizę wpływu inhibitora BAY na starsze osobniki. Wykazano, że podanie BAY spowodowało istotny statystycznie wzrost ekspresji aż 340 białek, przy czym ich stężenia były co najmniej dwukrotnie wyższe w porównaniu z poziomami obserwowanymi u starszych zwierząt z grupy kontrolnej. Co szczególnie istotne, około **18 % z tych białek jest bezpośrednio związanych z transmisją synaptyczną, różnicowaniem neuronów oraz rozwojem mózgu, co jednoznacznie wskazuje na odmłodzenie profilu białkowego w wyniku długotrwałego zahamowania rozkładu glikogenu** (Rycina 7).

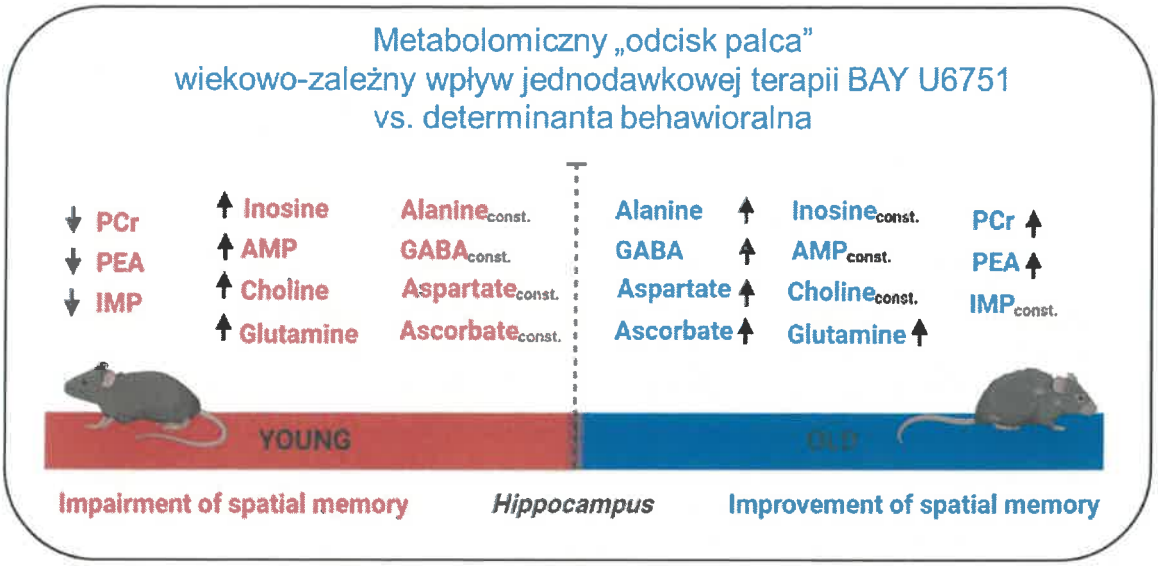
Aktualnie w trakcie przygotowania jest szersza i bardziej szczegółowa analiza danych proteomicznych, mająca na celu identyfikację poszczególnych białek lub grup białek wrażliwych na procesy fizjologicznego starzenia się, które zostały „odtworzone" podczas podawania inhibitora rozkładu glikogenu. W ten sposób podejmujemy **próbę wskazania potencjalnych białek docelowych (terapeutyczno-celowanych), które są kluczowe dla utrzymania prawidłowych funkcji poznawczych i które mogłyby być reaktywowane poprzez stosunkowo proste interwencje farmakologiczne –** np. restrykcję energetyczną lub farmakologiczną indukcję aktywności metabolicznej w komórkach tkanki nerwowej. Analiza będzie prowadzona oddzielnie dla hipokampu, kory oraz móżdżku, przy czym z naszych występnych danych wynika, że to hipokamp wykazuje największą podatność na działanie inhibitora BAY, który „odmładza" go na wielu poziomach funkcjonalnych (1#, 6#, 7#, 8#).

Obraz działania inhibitora BAY uzupełniły wyniki opublikowane ostatnio w 2024r., a **uzyskane dla krótkoterminowej administracji dootrzewnowej** (8#). **Inhibitor BAY podano jednorazowo** (*„One Dose of BAY"* Rycina 8) i przetestowano jego działanie 6h po administracji dootrzewnowej, analogicznie do wcześniejszych eksperymentów. Porównywano dwie grup wiekowe: myszy młode (8 tygodniowe) i myszy stare (prawie 2 letnie). Zmodyfikowane eksperymenty behawioralne umożliwiły dodatkowo odrębne zdiagnozowanie krótkotrwałej pamięć przestrzennej, zależnej typowo do hipokampu (NOL) oraz odrębne zdiagnozowanie krótkotrwałej pamięci rozpoznawania nowości, zależnej od struktur korowych (NOR). Otrzymane wyniki jeszcze dokładniej pozwoliły wnioskować, iż zaburzenie ANLS wpływa negatywnie tylko na hipokamp młodych zwierząt (otrzymano negatywny wynik NOL przy zachowaniu pełnych funkcji korowych - stabilny wynik NOR; Rycina 8). Dodatkowo w tych samych eksperymentach behawioralnych, zahamowanie rozkładu glikogenu wręcz "odmłodziło" zdolności kognitywne związane z funkcją hipokampu u zwierząt starych (pozytywny wynik NOL po dawce BAY, Rycina 8B), ponownie przy zachowaniu niezmienionych funkcji korowych (stabilny wynik NOR, Rycina 8C).



Rycina 8. Hamowanie fosforylazy glikogenowej stymuluje tworzenie pamięci zależnej od hipokampu u 20-22-miesięcznych myszy. (A) Schematyczne przedstawienie eksperymentu behawioralnego. (B,C) Czas eksploracji obiektów podczas sesji testu NOL (B) i NOR (C), po pojedynczej dawce BAY U6751 (*One Dose of BAY*). Zaobserwowaliśmy istotny wzrost orientacji przestrzennej zależnej od hipokampu u myszy O-BAY i istotny spadek u myszy Y-BAY (B). Jednocześnie, zależna od struktur korowych, zdolność rozpoznawania nowych obiektów była zachowana we wszystkich analizowanych grupach (C). Miarą zdolności kognitywnych jest istotnie statystycznie wydłużenie czasu eksploracji obiektów zmieniających położenie (*moved object*) lub nowych obiektów (*novel object*), względem obiektów znanych (odpowiednio *constant object*, *familiar object*). Wskazano statystycznie istotne zmiany między grupami (*$p < 0,05$; **$p < 0,01$; ***$p < 0,001$). Zastosowane skróty: NOL – test rozpoznawania nowego położenia obiektu (*Novel object location test*); NOR – test rozpoznawania nowego obiektu (*Novel object recognition test*); Y-CTR – osobniki młode kontrolne; Y-BAY – osobniki młode traktowane inhibitorem BAY U6751, O-CTR – osobniki stare kontrolne; O-BAY - osobniki stare traktowane inhibitorem BAY U6751.(Dane opracowano na podstawie publikacji 8#).

Potwierdzenie wcześniejszych wyników i hipotez (1#-7#), przy zastosowaniu zaledwie pojedynczej dawki inhibitora, skłoniło nas do przeanalizowania innych – bardziej "chwilowych" parametrów tkankowych niż dotychczas. Pobrane tkanki z zwierząt uczestniczących w procedurach behawioralnych, zostały przeznaczane na **wykreślenie profilu metobolomicznego, gdzie skład i stężenia relatywne metabolitów, są jak "odcisk palca" zdarzeń przebiegających w komórkach**. Przeanalizowano wpływ BAY w hipokampie, korze i móżdżku, gdzie każda z tych struktur inaczej odpowiadała na zmiany metaboliczne (8#). Co ważne, obraz metaboliczny ten został uzyskany po stymulacji behawioralnej, która to potencjuje aktywność sieci neuronalnych, aktywując mechanizmy plastyczności synaptycznej (jak elektrostymulacja w pomiarach na tkance 1#). Uogólniając, ponownie zaobserwowano największe zmiany związane z procesem starzenia, ale również pozytywny wpływ inhibitora BAY na funkcjonalność starszych zwierząt, szczególnie w kontekście hipokampu. Schemat zaprezentowany w publikacji 8# podsumowuje zmiany metaboliczne, które różnicują zwierzęta młode od starych, szczególnie pod kątem wrażliwości na blokowanie rozkładu glikogenu. W dużym skrócie, można stwierdzić, że **związane z wiekiem negatywne zmiany metabolomiczne zostały niemal całkowicie zniwelowane po jednej dawce inhibitora BAY U6751** (8#) (Rycina 9).



Rycina 9. Metabolomiczny „odcisk palca" ilustrujący wpływ jednokrotnej dawki inhibitora fosforylazy glikogenowej (BAY U6751) na młode i stare zwierzęta, w kontekście zmian w formowaniu pamięci przestrzennej w hipokampie. *„Const."* oznacza brak zmian, podczas gdy strzałki wskazują na wzrost lub spadek stężenia metabolitów pod wpływem farmakostymulacji. Jednokrotna dawka BAY U6751 spowodowała upośledzenie orientacji przestrzennej u młodych myszy (z ang. *impairment of spatial memory*), podczas gdy u osobników starych powoduje poprawę zdolności kognitywnych związanych z orientacją przestrzenną (z ang. *improvement of spatial memory*). Legenda: PCr – fosfokreatyna, PEA – O-fosfoetanolamina IMP – monofosforan inozyny; inosine – inozyna; AMP – monofosforan adenozyny; choline – cholina; glutamine – glutamina; alanine – alanina; GABA - kwas gamma-aminomasłowy; Aspartate – aspraginian; ascorbate – kwas askorbinowy.

4.5.1. Podsumowanie OSIĄGNIĘCIA nr II.

Wyniki przedstawione w badaniu profili proteomicznych zwierząt w różnym wieku (młode vs. roczne vs. 2 letnie) pokazują, że starzenie wiąże się z reorganizacją całego aparatu metabolizmu energetycznego zarówno w astrocytach, jak i w neuronach. Degradacja glikogenu w astrocytach powiązana jest z tzw. hipotezą wahadła mleczanowego astrocyty–neurony (ANLS), zgodnie z którą astrocytarny glikogen dostarcza mleczan wspierający metabolizm i plastyczność neuronalną. Nasze wyniki potwierdzają tę hipotezę, ale tylko u młodych myszy – tam rozkład kluczowych enzymów/metabolitów był zgodny z modelem ANLS.

W hipokampie młodych osobników stosunek *Pyg/Gys* (enzym degradacji/syntezy glikogenu) był bardzo wysoki i przypominał wartości obserwowane w białych włóknach mięśniowych, co wskazuje na szybkie epizody degradacji glikogenu i lokalne zwiększanie produkcji mleczanu wspierającego neuronalną fosforylację oksydacyjną (OXPHOS). Sugeruje to, że ANLS odgrywa szczególnie ważną rolę podczas intensywnej aktywności komórkowej, np. w procesie tworzenia pamięci (tzw. „LTP-ANLS").

Wraz ze starzeniem obserwowano wzrost stężenia enzymów metabolizmu glikogenu i ich relokację z astrocytów do neuronów (m.in. *Pygb* i *Pgm1*). Nasze badania wykazały, że hamowanie degradacji glikogenu u starych zwierząt poprawia plastyczność neuronalną i przywraca prawidłowe formowanie LTP, co sugeruje, że nadmierna aktywność *Pygb* w neuronach może być główną przyczyną pogorszenia pamięci w starzeniu. Jednocześnie w starych hipokampach wykazano ponad pięciokrotny wzrost poziomu Laforyny, białka związanego z syntezą glikogenu, co w połączeniu z podwyższonym *Pgm* sugeruje nadmierną akumulację glikogenu w neuronach – zjawisko szkodliwe i związane z neurodegeneracją

(*Lafora disease*, (Gentry et al., 2018). Ponadto u starszych myszy zaobserwowano zmniejszoną zdolność astrocytów do glikolizy i spadek liczby transporterów mleczanu (*Mct1*), przy równoczesnym wzroście neuronalnej produkcji tego metabolitu. Sugeruje to częściowe odwrócenie klasycznego ANLS – w kierunku transportu mleczanu z neuronów do astrocytów (tzw. NALS). Trzeba też pamiętać, iż jednocześnie mleczan, niezależnie od roli energetycznej, może pełnić funkcję cząstki sygnałowej poprzez nowoodkryte receptory dla mleczanu GPR 81 (Matsui & Soya, 2025), co nie zostało jeszcze dobrze poznane.

Dane wskazują, że starzenie wiąże się z przesunięciem metabolizmu glukozy i glikogenu z astrocytów do neuronów, utratą prawidłowego działania ANLS i LTP-ANLS oraz zwiększoną ekspresją białek macierzy zewnątrzkomórkowej, co może ograniczać kontakt neuron–astrocyt i dodatkowo pogłębiać zaburzenia plastyczności synaptycznej. Nasze wyniki wskazują, że w warunkach bazowej stymulacji, gdy nie dochodzi do indukcji plastyczności, mleczan nie odgrywa kluczowej roli. Jednak w momencie indukcji, zahamowanie jego podaży poprzez blokowanie rozkładu glikogenu (BAY U6751) prowadzi do zaburzenia tych procesów. Choć pełny mechanizm nie został jeszcze wyjaśniony, jest oczywiste, że udział tego szlaku jest niezbędny dla prawidłowego przebiegu procesów plastyczności.

Co istotne, mechanizm ten wydaje się sprawdzać przede wszystkim w młodych organizmach. W tkankach i zwierzętach starych zaobserwowaliśmy odmienny obraz – glikogen i szlak ANLS nie odgrywają tak istotnej roli w tworzeniu śladów pamięciowych. Co więcej, **zastosowanie inhibitora BAY U6751 przynosiło wręcz korzystne efekty, wpływając pozytywnie na kondycję tkanki, plastyczność, funkcje poznawcze, profil białkowy i metabolomiczny, a także na morfologię komórek, zwłaszcza profil kolców dendrytycznych.**

Uzyskany obraz jest spójny i powtarzalny na różnych poziomach analizy – *in vivo, ex vivo*. Ponadto dysponujemy szeregiem danych nieopublikowanych, które uzupełniają ten obraz. Dotyczą one m.in. zmian w profilach białkowych określanych roboczo jako „odzyskiwane", czyli takich, które zwykle zanikają wraz z wiekiem, a ich ekspresja jest przywracana po podaniu inhibitora BAY U6751. Wyniki wskazują także, że inhibitor może wpływać na podstawowe mechanizmy regulacji w komórce, m.in. procesy epigenetyczne, takie jak zmiany poziomu metylacji czy 8-oksoguaniny na powierzchni DNA. To może stanowić początkowy etap prowadzący do modyfikacji profilu białkowego i metabolicznego, a w konsekwencji – do poprawy zdolności plastyczności synaptycznej i funkcji poznawczych starych zwierząt.

Wielowymiarowe wyniki jednoznacznie wskazują, że zmiany dotyczące szlaku ANLS koncentrują się głównie w obrębie struktur hipokampalnych. Choć inne obszary mózgu również wykazują zmiany związane ze starzeniem i reagują na obecność inhibitora w tkance, to właśnie hipokamp wydaje się najbardziej wrażliwy i dominujący w tym procesie. Proponowany przez nas najbardziej prawdopodobny mechanizm molekularny, wyjaśniający obserwowane różnice, obejmuje zależne od wieku różnice w metabolizmie glikogenu astrocytów i neuronów. Mogą one powodować deregulacje lokalnych stężeń mleczanu zarówno w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jak i wewnątrz neuronów, a w konsekwencji zaburzać stosunek $NADH/NAD^+$ w neuronach, który ma kolosalny wpływ na szereg przemian komórkowych. Postulujemy, iż podwyższony poziom mleczanu, a tym samym zwiększone zakwaszenie mózgu u starszych zwierząt (Ross et al., 2010; Zhu et al., 2015) mogą ograniczać plastyczność, co można złagodzić poprzez hamowanie rozkładu glikogenu. **Wyniki te dostarczają dowodów, że modulacja metabolizmu glikogenu może być nową strategią w leczeniu zaburzeń kognitywnych związanych z procesami fizjologicznego starzenia się.** Wymagane są jednak dalsze badania nad długotrwałym wpływem inhibitorów fosforylazy glikogenowej, alternatywnymi drogami podawania (doustną, dożylną) oraz ich skutkami w różnych obszarach mózgu i funkcjach poznawczych.

4.6. Plany BADAWCZE.

Każdy z przeprowadzonych testów z użyciem zwierząt pozwolił na pobranie szerokiego zakresu tkanek, obejmującego: hipokamp (opisany w publikacjach), **nieopublikowane dotąd dane dla kory, móżdżku oraz tkanek obwodowych – wątroby, mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych, a także materiału z krwi obwodowej, śledziony (splenocytów), wyizolowanych mikropęcherzyków i DNA.** Dysponujemy w ten sposób bogatym materiałem badawczym, umożliwiającym dalsze analizy porównawcze dla czterech grup: młodych zwierząt kontrolnych (Y-CTR), młodych traktowanych inhibitorem (Y-BAY), starszych kontrolnych (O-CTR) oraz starszych traktowanych inhibitorem (O-BAY).

Obecnie opracowywane są bazy danych proteomicznych (szczegóły w Osiągnięciu nr II) dotyczące prób traktowanych inhibitorem rozkładu glikogenu. W przyszłości planowane są analizy obejmujące:

- zmienność profili metabolomicznym tkanek obwodowych (wątroby, mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych – **dane w opracowaniu do publikacji**);
- zmiany epigenetyczne w DNA (**dane w opracowaniu**);
- zmiany w profilu lipidomicznym (**dane w opracowaniu**);
- analiza mikropęcherzyków z krwi obwodowej (**dane w opracowaniu);**
- analiza układu immunologicznego **(dane w opracowaniu);**
- zmienność mRNA i ekspresji genów.

Celem jest rozszyfrowanie mechanizmu molekularnego odpowiadającego za obserwowany pozytywny wpływ zahamowania rozkładu glikogenu na zdolności poznawcze starszych osobników.

Należy jednak podkreślić, że większość analiz „omicznych" wykonywanych na tkankach nie pozwala precyzyjnie określić rodzaju komórek (neurony, astrocyty, mikroglej, oligodendrocyty). W związku z tym podjęto równolegle **badania z wykorzystaniem pierwotnych linii komórkowych,** w których można dokładnie kontrolować charakter hodowli neuronów i astrocytów. Ta część badań jest m.in. elementem pracy doktorskiej Natalii Pudełko-Malik. Wspólnie z moją doktorantką i grupą badawczą dr Stanisława Deja (University of Texas Southwestern Medical Center, Burgess Lab, Dallas, USA) przeprowadzono już serię eksperymentów w systemie izolowanych neuronów i astrocytów. Wstępne dane zostały opublikowane w formie **preprintu** i obecnie przygotowywane jest pełne opracowanie (Pudelko-Malik et al., 2025). Przeprowadzone badania z użyciem technik LC-MS i NMR w izolowanych hodowlach pierwotnych neuronów i astrocytów, w stanie spoczynku oraz podczas aktywności sieci neuronowych (w schemacie indukcji chemicznego LTP) pozwalają na:

- identyfikację komórek wrażliwych na obecność inhibitora BAY;
- określenie zmian metabolicznych związanych ze wzmożonym zapotrzebowaniem energetycznym podczas indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (chemiczne LTP jako model tworzenia śladów pamięciowych);
- dokładniejsze powiązanie obserwowanych efektów fenotypowych z konkretnymi typami komórek.

Takie podejście umożliwia bardziej precyzyjne rozumienie mechanizmów działania inhibitora BAY na poziomie komórkowym i molekularnym oraz pozwala na projektowanie przyszłych interwencji terapeutycznych ukierunkowanych na poprawę funkcji poznawczych.

4.7. Bibliografia:

Basu, S., Plewczynski, D., Saha, S., Roszkowska, M., Magnowska, M., Baczynska, E., & Wlodarczyk, J. (2016). 2dSpAn: semiautomated 2-d segmentation, classification and analysis of hippocampal dendritic spine plasticity. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *32*(16), 2490–2498. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW172

Bélanger, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2011). Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism*, *14*(6), 724–738. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016

Bergans, N., Stalmans, W., Goldmann, S., & Vanstapel, F. (2000). Molecular mode of inhibition of glycogenolysis in rat liver by the dihydropyridine derivative, BAY R3401: Inhibition and inactivition of glycogen phosphorylase by an activated metabolite. *Diabetes*, *49*(9), 1419–1426. https://doi.org/10.2337/diabetes.49.9.1419

Berry, K. P., & Nedivi, E. (2017). Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron*, *96*(1), 43–55. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.008

Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2011). Coordination of size and number of excitatory and inhibitory synapses results in a balanced structural plasticity along mature hippocampal CA1 dendrites during LTP. *Hippocampus*, *21*(4), 354–373. https://doi.org/10.1002/HIPO.20768

Campbell, S., & MacQueen, G. (2004). The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, *29*(6), 417 LP – 426. http://jpn.ca/content/29/6/417.abstract

Chang, J. Y., Parra-Bueno, P., Laviv, T., Szatmari, E. M., Lee, S. J. R., & Yasuda, R. (2017). CaMKII Autophosphorylation Is Necessary for Optimal Integration of Ca2+ Signals during LTP Induction, but Not Maintenance. *Neuron*, *94*(4), 800-808.e4. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.041

De Luca, C., & Papa, M. (2016). Looking Inside the Matrix: Perineuronal Nets in Plasticity, Maladaptive Plasticity and Neurological Disorders. In *Neurochemical Research* (Vol. 41, Issue 7, pp. 1507–1515). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/s11064-016-1876-2

Ellison, D. W., Beal, M. F., & Martin, J. B. (1987). Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. *Brain Research*, *417*(2), 389–392. https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90471-9

Gentry, M. S., Guinovart, J. J., Minassian, B. A., Roach, P. J., & Serratosa, J. M. (2018). Lafora disease offers a unique window into neuronal glycogen metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(19), 7117–7125. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.803064

Gibbs, M. E., Anderson, D. G., & Hertz, L. (2006). Inhibition of glycogenolysis in astrocytes interrupts memory consolidation in young chickens. *GLIA*, *54*(3), 214–222. https://doi.org/10.1002/glia.20377

Gibbs, M. E., O'dowd, B. S., Hertz, E., & Hertz, L. (2006). Astrocytic energy metabolism consolidates memory in young chicks. *Neuroscience*, *141*(1), 9–13. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.038

Gregus, Z., & Németi, B. (2007). Glutathione-dependent reduction of arsenate by glycogen phosphorylase responsiveness to endogenous and xenobiotic inhibitors. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, *100*(1), 44–53. https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFM212

Haber, M., Zhou, L., & Murai, K. K. (2006). Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(35), 8881–8891. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1302-06.2006

Halassa, M. M., Fellin, T., & Haydon, P. G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, *13*(2), 54–63. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.12.005

Henley, J. M., & Wilkinson, K. A. (2013). AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *15*(1), 11–27. https://doi.org/10.31887/DCNS.2013.15.1/JHENLEY

Krzystyniak, A., Baczynska, E., Magnowska, M., Antoniuk, S., Roszkowska, M., Zareba-Koziol, M., Das, N., Basu, S., Pikula, M., & Wlodarczyk, J. (2019). Prophylactic Ketamine Treatment Promotes Resilience to Chronic Stress and Accelerates Recovery: Correlation with Changes in Synaptic Plasticity in the CA3 Subregion of the Hippocampus. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(7). https://doi.org/10.3390/IJMS20071726

Kumar, A. (2011). Long-Term Potentiation at CA3-CA1 Hippocampal Synapses with Special Emphasis on Aging, Disease, and Stress. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *3*(MAY), 1–20. https://doi.org/10.3389/FNAGI.2011.00007

Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. In *Neuron* (Vol. 44, Issue 1, pp. 5–21). Neuron. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012

Matsui, T., & Soya, H. (2025). The Dual Role of Lactate in the Exercising Brain: Fueling Energy and Signaling Fatigue. *Advances in Neurobiology*, *44*, 207–216. https://doi.org/10.1007/978-981-95-0066-6_11

Mozrzymas, J., Szczesny, T., & Rakus, D. (2011). The effect of glycogen phosphorolysis on basal glutaminergic transmission. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *404*(2), 652–655. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.033

Paoletti, L., Elena, C., Domizi, P., & Banchio, C. (2011). Role of phosphatidylcholine during neuronal differentiation. *IUBMB Life*, *63*(9), 714–720. https://doi.org/10.1002/IUB.521

Parpura, V., & Zorec, R. (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Research Reviews*, *63*(1–2), 83–92. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.008

Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(22), 10625–10629. https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10625

Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (2012). Sweet Sixteen for ANLS. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *32*(7), 1152–1166. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.149

Petralia, R. S., Mattson, M. P., & Yao, P. J. (2014). Communication breakdown: The impact of ageing on synapse structure. *Ageing Research Reviews*, *14*(1), 31–42. https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.01.003

Pudelko-Malik, N., Drulis-Fajdasz, D., Fydryszewski, M., Burgess, S., Mlynarz, P., Rakus, D., & Deja, S. (2025). Glucose-dependent metabolism of hippocampal primary neurons in response to chemically induced long-term potentiation. *BioRxiv : The Preprint Server for Biology*. https://doi.org/10.1101/2025.02.24.639988

Riederer, P., Konradi, C., Schay, V., Kienzl, E., Birkmayer, G., Danielczyk, W., Sofic, E., & Youdim, M. B. (1987). Localization of MAO-A and MAO-B in human brain: a step in understanding the therapeutic action of L-deprenyl. *Advances in Neurology*, *45*, 111–118. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3030067/

Rosenzweig, E. S., & Barnes, C. A. (2003). Impact of aging on hippocampal function: Plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in Neurobiology*, *69*(3), 143–179. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00126-0

Ross, J. M., Öberg, J., Brené, S., Coppotelli, G., Terzioglu, M., Pernold, K., Goiny, M., Sitnikov, R., Kehr, J., Trifunovic, A., Larsson, N. G., Hoffer, B. J., & Olson, L. (2010). High brain lactate is a hallmark of aging and caused by a shift in the lactate dehydrogenase A/B ratio. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(46), 20087–20092. https://doi.org/10.1073/PNAS.1008189107

Sun, D. G., Kang, H., Tetteh, H., Su, J., Lee, J., Park, S. W., He, J., Jo, J., Yang, S., & Yang, S. (2018). Long term potentiation, but not depression, in interlamellar hippocampus CA1. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/S41598-018-23369-4;TECHMETA

Suzuki, A., Stern, S., Bozdagi, O., Huntley, G., Walker, R., Magistretti, P., & Alberini, C. (2011). Astrocyte-Neuron Lactate Transport Is Required for Long-Term Memory Formation. *Cell*, *144*(5), 810–823. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.018

Testa, D., Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2019). Perineuronal nets in brain physiology and disease. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 89, pp. 125–135). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.09.011

Toni, N., Teng, E. M., Bushong, E. A., Aimone, J. B., Zhao, C., Consiglio, A., Van Praag, H., Martone, M. E., Ellisman, M. H., & Gage, F. H. (2007). Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nature Neuroscience*, *10*(6), 727–734. https://doi.org/10.1038/NN1908

Vezzoli, E., Calì, C., De Roo, M., Ponzoni, L., Sogne, E., Gagnon, N., Francolini, M., Braida, D., Sala, M., Muller, D., Falqui, A., & Magistretti, P. J. (2020). Ultrastructural Evidence for a Role of Astrocytes and Glycogen-Derived Lactate in Learning-Dependent Synaptic Stabilization. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *30*(4), 2114–2127. https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHZ226

Voutsinos-Porche, B., Bonvento, G., Tanaka, K., Steiner, P., Welker, E., Chatton, J. Y., Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (2003). Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron*, *37*(2), 275–286. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01170-4

Wayman, G. A., Lee, Y. S., Tokumitsu, H., Silva, A., & Soderling, T. R. (2008). Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity. *Neuron*, *59*(6), 914–931. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.021

Wiśniewski, J. R. (2016). Quantitative Evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and Multienzyme Digestion FASP Protocols. *Analytical Chemistry*, *88*(10), 5438–5443. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00859

Wiśniewski, J. R., & Gaugaz, F. Z. (2015). Fast and sensitive total protein and Peptide assays for proteomic analysis. *Analytical Chemistry*, *87*(8), 4110–4116. https://doi.org/10.1021/ac504689z

Wiśniewski, J. R., Hein, M. Y., Cox, J., & Mann, M. (2014). A "Proteomic Ruler" for Protein Copy Number and Concentration Estimation without Spike-in Standards. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(12), 3497–3506. https://doi.org/10.1074/mcp.M113.037309

Zhu, X. H., Lu, M., Lee, B. Y., Ugurbil, K., & Chen, W. (2015). In vivo NAD assay reveals the intracellular NAD contents and redox state in healthy human brain and their age dependences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(9), 2876–2881. https://doi.org/10.1073/PNAS.1417921112

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

W punkcie piątym mojego wniosku o przyznanie stopnia doktora habilitowanego, chciałabym przedstawić mój wkład w rozwój Dziedziny Nauk Biologicznych głównie z okresu wcześniejszych etapów kariery zawodowej (lata 1995-2010, **Etap nr I – III**). Jest to poniekąd dorobek poprzedzający i przygotowujący mnie do tematyki, która stała się obecnie moim głównym zagadnieniem naukowym. W tego okresu wyniosłam bowiem niebagatelny bagaż doświadczeń pracy w różnych środowiskach naukowych, jako student, doktorant na Uniwersytecie Wrocławskim, jako doktorant na praktykach zagranicznych w Belgii i w końcu, jako pracownik techniczno-naukowy w laboratorium diagnostycznym, a później w laboratorium naukowym, przy Klinice Nefrologii Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Charakter projektów, w których miałam sposobność uczestniczyć i zaufanie przełożonych, którzy pozwalali mi na podejmowanie samodzielnych decyzji naukowych, spowodowało, iż już w czasie studiów na kierunku Biotechnologia (UWr), podejmowałam współpracę z instytucjami zewnętrznymi, by realizować swoje pomysły na naukę. W toku mojej kariery zawodowej rozwijałam, i nadal rozwijam, umiejętność inicjowania współpracy z coraz szerszym kręgiem osób, by podejmować nowe wyznawania badawcze i efektywnie realizować plany eksperymentalne.

Poniżej szereguję zagadnienia naukowe (projekty) i osiągnięcia (prace dyplomowe, publikacje, komunikaty konferencyjne, wystąpienia), które były (są) efektem nawiązanych kooperacji podczas studiów dziennych (**Etap nr I, Rozdział 5.1**), studiów doktoranckich (**Etap nr II, Rozdział 5.2**) oraz w ramach zadań przypisanych pracy w przeciągu 5 lat aktywności zawodowej na Akademii Medycznej we Wrocławiu na stanowisku naukowo – technicznym (**Etap nr III, Rozdział 5.3**).

Pracę na Uniwersytecie Wrocławskim jako adiunkt traktuję jako **Etap nr IV** mojej kariery zawodowej (od 2010 roku, **Rozdział 5.4)**. Dorobek naukowy, który jest głównym wątkiem tego Autoferatu (Rozdział 4) nie mógłby być efektywnie realizowany, gdyby nie wielokierunkowość badań, w których były zaangażowane różne grupy badawcze. Współpraca z nimi zaowocowała dodatkowymi projektami i osiągnięciami, które równolegle towarzyszyły mojej głównej pracy badawczej. Dlatego też w **Rozdziale 5.4** zamieszczam wykaz dodatkowych aktywności i wymieniam instytucje zewnętrzne, z szerokim ukłonem w stronę osób odpowiedzialnych, a z którymi miałam przyjemność współpracować i nadal kontynuuje wymianę myśli naukowych. Projekty te umożliwiły mi zdobycie nowych umiejętności oraz zdobycie bezcennej wiedzy praktycznej i teoretycznej - znacznie poszerzyły horyzonty mojej działalności naukowej.

Przy każdym z wymienionych aktywności byłam bezpośrednio zaangażowaną w projektowanie doświadczeń, przeprowadzanie eksperymentów i analizę danych oraz opracowywanie wyników do różnego charakteru prezentacji naukowych. Swoją rolę w poszczególnych projektach i wystąpieniach konferencyjnych oznaczyłam hasłowo odpowiednio jako: „Koordynator i Wykonawca", „Wykonawca", tudzież mój udział w komunikacie konferencyjnym w postaci plakatu („Poster"), lub odpowiednio mojego wystąpienia ustnego na konferencjach międzynarodowych jako „Oral Presentation" (w przypadku prezentacji przez osoby trzecie – nazwisko zostało wyszczególnione przy danym podpunkcie). **Wymienione tu aktywności zawierają również dodatkowy dorobek naukowy i „networkingowy", który wychodzi poza treści i aktywności stanowiące podstawę do wniosku o habilitację** (opisane szczegółowo w Rozdziale 4).

5.1. Etap nr I (1995-2000): Studia dzienne na Wydziale Nauk Przyrodniczych, kierunek Biotechnologia Uniwersytet Wrocławki.

Tematy badawcze Etap nr I:

1997-1998 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych, praca licencjacka pt.: **„Nowe generacje szczepionek przeciwbakteryjnych",** pod opieką prof. Andrzeja Gamiana. **(Koordynator i Wykonawca)**

1998 - 2000 Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Zakład Inżynierii Białka, pod opieką prof. Jacka Otlewskiego. Projekt związany z **analizą mutacyjną drugiej domeny mysiego czynnika transkrypcyjnego Zif 268.2** w celu poszukiwania stabilnej struktury palca cynkowego, przy jednoczesnym wyeliminowaniu jonu cynku (Zn^{+2}). Badania w oparciu o technikę PD oraz pomiary oddziaływań peptyd – DNA. **(Koordynator i Wykonawca)**

Dorobek Etap nr I: **Obrona pracy licencjackiej** pt.: „Nowe generacje szczepionek przeciwbakteryjnych"; pod opieką prof. Andrzeja Gamiana.

Obrona pracy magisterskiej pt.: „Konstrukcja biblioteki drugiej domeny mysiego czynnika transkrypcyjnego Zif 268.2 prezentowanej na powierzchni faga M13"; pod opieką prof. Jacka Otlewskiego.

5.2. Etap nr II (2000– 2006): Studia doktoranckie na Wydziale Nauk Przyrodniczych, kierunek Biotechnologia Uniwersytet Wrocławki, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Zakład Inżynierii Białka, pod opieką prof. Jacka Otlewskiego.

Zagraniczne staże naukowe - Etap nr II:

W ramach grantu Howard Huges Medical Institute INTL/55000329/2000r, odbyłam **trzymiesięczny naukowy staż zagraniczny (kwiecień – czerwiec 2000)** i **cztery wyjazdy tygodniowe (grudzień 2000, maj 2001, wrzesień 2001 wrzesień 2002)** zagraniczne do laboratorium prof. Serge Muyldermans, Camel Heavy Chain Antibodies and Single-Domain Antibodies VIB Department of Molecular and Cellular Interactions, Vrije Universiteit Brussel.

Jako poświadczenie wyjazdu przedkładam referencje prof. Serge Muyldermans w Załączniku nr 8 do wniosku o habilitację.

Tematy badawcze Etap nr II:

2000 - 2002 Badania wykonywane w ramach grantu Howard Huges Medical Institute INTL/55000329/2000r pt. **"Phage display of camel antibody and peptide libraries",** przy współpracy z Vrije Universitet Brussel (Belgia) oraz z Akademią Rolniczą we Wrocławiu (personel weterynaryjny). **(Koordynator i Wykonawca)**. Zrealizowane badania w Polsce i w Belgii miały być włączone do mojej rozprawy doktorskiej, jednakże z racji braku pozytywnych wyników, zadecydowano w 2002 o zmianie tematu pracy, przez co finalnie wyniki te nie ujrzały światła dziennego. Niemniej jednak, zdobyte przeze mnie umiejętności twarde i miękkie **(zakres opanowanych technik laboratoryjnych oraz umiejętność w pracy w laboratorium zagranicznym)** jest nieocenionym dorobkiem tego projektu.

2003 Projekt dotyczący **zmiany specyficzności enzymów restrykcyjnych (np. *BfiI*),** przy współpracy z prof. V. Siksnys, Instytut Biotechnologii (Wilno, Litwa), Uniwersytet Wrocławski pod opieką prof. Jacka Otlewskiego. **(Wykonawca)**

2003 – 2005 Projekt będący podstawą dysertacji doktorskiej pt. **„Peptydy oddziałujące z małymi białkami G".** Badania w oparciu o technikę PD (z ang. *phage display)* oraz szeroki zakres pomiarów oddziaływań peptyd - białko, białko – białko; Uniwersytet Wrocławski pod opieką prof. Jacka Otlewskiego. **(Koordynator i Wykonawca)**

Dorobek Etap nr II: **Obrona pracy doktorskiej** pt: „Peptydy oddziałujące z małymi białkami G", Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Zakład Inżynierii Białka, pod opieką prof. Jacka Otlewskiego;

Publikacje:

2005 Cierpicki, T., **Drulis-Fajdasz, D.,** Krowarsch, D., Jelen, F., Mateja, A., Oleksy, A., Zakrzewska, M. & Otlewski, J. (2005) "Protein Engineering Applications", Acta Biochim. Pol., 52, supp. 1, p.41.

2006 **Drulis-Fajdasz D**, Jelen F, Oleksy A, Otlewski J. Novel peptide recognized by RhoA GTPase. Acta Biochim Pol. 2006;53(3):515-24. Epub 2006 Oct 1. PMID: 17019437.

Wystąpienia/komunikaty konferencyjne:

2001 Molecular biotechnology in XXI century, IV scientific seminar organized by International Institute of Molecular and Cell Biology UNESCO and Institute of Biochemistry and Molecular Biology University of Wroclaw, 18-22 May, Zakopane, Polska **(Oral Presentation)**

2004 Meeting of International Research Scholars of Howard Hughes Medical Institute, June 23-26, p. 96, Tallinn, Estonia **(Poster)**

2004 The ELSO 2004 Conference, 04 – 08 September, Nice, France. **Drulis-Fajdasz D.,** Jeleń F., Oleksy A., Otlewski J.. *Novel peptides recognized by GTPase RhoA*. (P-10), p. 34 **(Poster)**

2004 Winter School on Protein Structure and Function, IV scientific seminar organized by International Institute of Molecular and Cell Biology UNESCO and Institute of Biochemistry and Molecular Biology University of Wroclaw, 15-20 March, Zakopane, Poland **(Oral Presentation)**

Konferencje:

2001 „Recombinant therapeutics: antibodies and biomolecules", Conference organised by Cambridge Healthtech Insitute (CHI), USA, Baltimore, Maryland, May 30-June 1, 2001 **(Uczestnik bierny)**

5.3. Etap III (2005-2010): Praca na stanowisku techniczno-naukowym - Laboratorium Immunologii Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademicki Szpital Kliniczny we Wrocławiu oraz Laboratorium Specjalistycznym Katedry i Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, pod opieką prof. Mariana Klingera.

Tematy badawcze Etap nr III:

2005 – 2010 projekty ministerialne i Akademii Medycznej we Wrocławiu przyznawane dla pracowników Katedry i Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademickiego Szpitalu Klinicznego oraz Akademii Medycznej we Wrocławiu (obecnie Uniwersytety Medycznego we Wrocławiu):

- Zastosowanie fotoferezy pozaustrojowej w indukcji tolerancji immunologicznej i leczeniu odrzucania aloprzeszczepu nerki. Projekt badawczy Ministerstwa Edukacji i Nauki nr 1789/B/PO1/2008/34. (**Wykonawca**)
- Komórki regulatorowe, jako wskaźnik odpowiedzi immunologicznej na alloprzeszczep u biorców z długotrwale prawidłową i upośledzoną funkcją przeszczepionej nerki. Projekt badawczy Ministerstwa Edukacji i Nauki nr GR-669/2007. (**Wykonawca**)
- Wpływ śmierci mózgowej dawcy, okresu przechowywania i reperfuzji na ekspresję genów oraz aktywację tkankową w przeszczepionej nerce. Projekt badawczy Ministerstwa Edukacji i Nauki nr GR-629/2005. (**Wykonawca**)
- Opracowanie systemu analizy obrazów uzyskiwanych w immunoenzymatycznej wizualizacji aktywności wydzielniczej limfocytów metodą ELISPOT. Projekt badawczy Ministerstwa Edukacji i Nauki nr GR-636/2005. (**Wykonawca**)
- Zmiany strukturalne i immunologiczne w nerce przeznaczonej do przeszczepienia – wpływ okresu zimnego i ciepłego niedokrwienia oraz reperfuzji. Projekt badawczy Ministerstwa Edukacji i Nauki nr GR-627/2005. (**Wykonawca**)
- Ocena stanu immunologicznego biorców przeszczepu nerki poprzez nieinwazyjne monitorowanie alloreaktywności komórkowej. Projekt badawczy Ministerstwa Edukacji i Nauki nr GR-626/2005. (**Wykonawca**)
- Apoptoza granulocytów krwi obwodowej w układowym zapaleniu naczyń – wpływ surowicy zawierającej przeciwciała antygranulocytarne ANCA. Wewnętrzny projekt badawczy AM Wrocław, nr 1485. (**Wykonawca**)
- Analiza mutacji genu strukturalnego podocytów, NPHS2, w poszukiwaniu podłoża genetycznego sterydooporności w przebiegu kłębuszkowych zapaleń nerek. Wewnętrzny projekt badawczy AM Wrocław, nr 1088. (**Wykonawca**)
- Wykorzystanie techniki ELISPOT do badania zależności między alloreaktywnością biorców przeszczepu nerki a występowaniem ostrych i przewlekłych reakcji odrzuceniowych. Wewnętrzny projekt badawczy AM Wrocław, nr 915. (**Wykonawca**)

Dorobek Etap nr III:

Publikacje:

2007 Banasik M, Boratyńska M, Nowakowska B, Hałoń A, Kościelska-Kasprzak K, **Drulis-Fajdasz D**, Patrzałek D, Weyde W, Klinger M. Variability in donor-specific alloantibody production after transplantation. Transplant Proc. 2007 Nov;39(9):2715-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2007.08.054. PMID: 18021966.

2007 Banasik M, Boratyńska M, Nowakowska B, Hałoń A, Kościelska-Kasprzak K, **Drulis-Fajdasz D**, Patrzałek D, Weyde W, Klinger M. C4D deposition and positive posttransplant crossmatch are

not necessarily markers of antibody-mediated rejection in renal allograft recipients. Transplant Proc. 2007 Nov;39(9):2718-20. doi: 10.1016/j.transproceed.2007.08.064. PMID: 18021967.

2008 Bieniecki, W., Grabowski, S., Kościelska-Kasprzak, K., **Drulis-Fajdasz, D.,** Mazanowska, O., Klinger, M., (2007). "An algorithm for smart ROI detection in ELISPOT examination images", Łódź, Poland, ISBN 978-83-7415-148-1: 133-136.

2008 Bieniecki, W., Krupiński M., Grabowski, S., Kościelska-Kasprzak, K., **Drulis-Fajdasz, D.,** Mazanowska, O., Klinger, M., (2008). "Unsupervised two-color ELISPOT image segmentation based on k-means clustering"; TCSET'2008, February 19-23, 2008 Lviv-Slavsko, Ukraine.

2008 Mazanowska, O., Kamińska, D., Kościelska-Kasprzak, K., **Drulis-Fajdasz, D.,** Krajewska, K., Falkiewicz, K., Hałoń, A., Chudoba, P., Polak, W., Patrzałek, D., Wikiera-Magott, I., Boratyńska, M., Klinger, M.: Hight risk of FSGS recurrence in kidney allograft recipients independent of heterozygous NPHS2 mutation. Adv.Clin.Exp.Med. 2008 Vol.17 no.2; pp. 207-212.

2009 Krajewska M, Kościelska-Kasprzak K, Weyde W, **Drulis-Fajdasz D**, Madziarska K, Mazanowska O, Kusztal M, Klinger M. Impact of donor-dependent genetic factors on long-term renal graft function. Transplant Proc. 2009 Oct;41(8):2978-80. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.08.027. PMID: 19857655.

2009 Kościelska-Kasprzak K, **Drulis-Fajdasz D,** Kaminska D, Mazanowska O, Krajewska M, Gdowska W, Bieniecki W, Chudoba P, Polak W, Janczak D, Patrzalek D, Klinger M. Pretransplantation cellular alloreactivity is predictive of acute graft rejection and 1-year graft function in kidney transplant recipients. Transplant Proc. 2009 Oct;41(8):3006-8. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.07.086. PMID: 19857662.

2009 Krajewska M, Kościelska-Kasprzak K, Weyde W, **Drulis-Fajdasz D,** Madziarska K, Mazanowska O, Kusztal M, Klinger M. Recipient genetic determinants of inflammatory process and nonstandard atherosclerosis risk factors affect kidney graft function early posttransplantation. Transplant Proc. 2009 Oct;41(8):3060-2. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.07.088. PMID: 19857676.

2010 Kusztal M, Kościelska-Kasprzak K, **Drulis-Fajdasz D,** Magott-Procelewska M, Patrzałek D, Janczak D, Chudoba P, Klinger M. The influence of CTLA-4 gene polymorphism on long-term kidney allograft function in Caucasian recipients. Transpl Immunol. 2010 Jul;23(3):121-4. doi: 10.1016/j.trim.2010.05.002. Epub 2010 May 12. PMID: 20470888.

2011 Iznerowicz A, Chudoba P, Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, **Drulis-Fajdasz D**, Hałoń A, Janczak D, Boratyńska M, Klinger M, Patrzałek D, Polak WG. Duration of brain death and cold ischemia time, but not warm ischemia time, increases expression of genes associated with apoptosis in transplanted kidneys from deceased donors. Transplant Proc. 2011 Oct;43(8):2887-90. doi: 10.1016/j.transproceed.2011.08.013. PMID: 21996180.

2011 Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, **Drulis-Fajdasz D**, Hałoń A, Polak W, Chudoba P, Jańczak D, Mazanowska O, Patrzałek D, Klinger M. Kidney ischemic injury genes expressed after donor brain death are predictive for the outcome of kidney transplantation. Transplant Proc. 2011 Oct;43(8):2891-4. doi: 10.1016/j.transproceed.2011.08.062. PMID: 21996181.

2016 Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, Chudoba P, Hałoń A, Mazanowska O, Gomółkiewicz A, Dzięgiel P, **Drulis-Fajdasz D**, Myszka M, Lepiesza A, Polak W, Boratyńska M, Klinger M. The influence of warm ischemia elimination on kidney injury during transplantation - clinical and molecular study. Sci Rep. 2016 Nov 3;6:36118. doi: 10.1038/srep36118. PMID: 27808277; PMCID: PMC5093711.

Wystąpienia/komunikaty konferencyjne:

2007 13th ESOT Conference, 29 September-3 October 2007, Prague, Czech Republic. Banasik M., Nowakowska B., Hałoń A., Kościelska-Kasprzak K., **Drulis-Fajdasz D.,** Polak W., Boratyńska M., Patrzałek D., Klinger M.. *C4D deposition and positive posttransplant cross-match are not necessarily markers of antibody-mediated rejection in renal allograft recipients*. Transplant International 20, supp. 2, p. 216 (P504); DOI:10.1111/j.1432-2277.2007.00573.x (**Poster**)

2007 13th ESOT Conference, 29 September-3 October 2007, Prague, Czech Republic. Mazanowska O., Kamińska D., Kościelska-Kasprzak K., **Drulis-Fajdasz D.**, Hałoń A., Krajewska M., Madziarska K., Falkiewicz K., Chudoba P., Polak W., Patrzałek D., Boratyńska M., Klinger M.. *High risk of FSGS recurrence in kidney allograft recipients independent of heterozygous NPHS2 mutation (229ARG/GLN).* Transplant International 20, supp. 2, p. 216 (P503); DOI:10.1111/j.1432-2277.2007.00573.x (**Poster**)

2007 13th ESOT Conference, 29 September-3 October 2007, Prague, Czech Republic. Banasik M., Nowakowska B., Hałoń A., Kościelska-Kasprzak K., **Drulis-Fajdasz D**., Polak W., Boratyńska M., Patrzałek D., Klinger M.. *Variability in donor-specific alloantibody production after transplantation*. Transplant International 20, supp. 2, p. 71 (O242); DOI:10.1111/j.1432-2277.2007.00573.x (**Oral Presentation** Banasik M.)

2007 VIII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, 11-13 maja 2007, Warszawa, Polska. Banasik M, Nowakowska B, Hałoń A., Kościelska-Kasprzak K, **Drulis-Fajdasz D.,** Polak W., Boratyńska M. Patrzałek D., Klinger M.: *Zmienność produkcji przeciwciał specyficznych dla dawcy po przeszczepie*. (P5 – **Poster)**

2008 XLV Congress of the European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA), 10-13 May, 2008, Stockholm, Sweden. Mazanowska, O., Kościelska Kasprzak, K., Kamińska, D., Krajewska, M., Madziarska, K., Kazimierczak, K., Penar, J., **Drulis-Fajdasz, D.**, Wikiera, I., Zwolińska, D., Klinger, M.: *The prevalence of podocin (NPHS2) mutations in patients with FSGS.* Nephrol. Dial. Transplant. Plus 2008 Vol.1 supl.2; s.ii241 poz.MP028 (**Poster**)

2008 XXII International Congress of The Transplantation Society, 10-14 August 2008, Sydney, Australia. Klinger, M., Krajewska, M., Kościelska-Kasprzak, K., **Drulis-Fajdasz, D**., Weyde, W., Madziarska, K., Mazanowska, O.. *Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) donor genetic polymorphisms are of significance in one-year kidney allograft function*. Transplantation 2008, Vol.86, no.2S, suppl.; s.63, poz.179 (**Poster**)

2008 XVII Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego „Nefrologia i dializoterapia polska", 5-7 czerwca 2008, Poznań, Polska. Mazanowska, O., Kościelska-Kasprzak, K., Kamińska, D., Krajewska, M., Madziarska, K., Penar J., **Drulis-Fajdasz, D.,** Wikiera I., Zwolińska D., Klinger, M.: *Występowanie mutacji genu dla podocyny (NPHS2) u pacjentów z FSGS*. (P20 – **Poster**)

2009 ESOT Basic Science Meeting & XI TTS Basic Science Symposium, March 12 - 15, 2009, Brussels, Belgium. **Drulis-Fajdasz, D.**, Kościelska-Kasprzak, K., Kaminska, D., Mazanowska, O., Krajewska, M., Bieniecki W., Patrzalek, D., Chudoba P., Jańczak D., Klinger M.. *Pretransplant cellular alloreactivity predicts kidney allograft rejection.* (P64 – **Poster**)

2009 American Transplant Congress, May 30-June 3, 2009, Boston, Massachusetts, USA. Kościelska-Kasprzak K., **Drulis-Fajdasz, D.**, Kaminska, D., Mazanowska, O., Krajewska, M., Bieniecki, W., Chudoba, P., Polak, W., Patrzalek, D., Klinger, M.. *Pre-transplant cellular*

alloreactivity is the risk factor for acute graft rejection in kidney transplant recipients. (P120-I – **Poster**)

2009 ESOT Congress, 30 August – 02 September, 2009, Paris, France. Kościelska-Kasprzak, K., **Drulis-Fajdasz, D.**, Kaminska, D., Mazanowska, O., Krajewska, M., Gdowska, W., Bieniecki, W., Chudoba, P., Polak, W., Janczak, D., Patrzalek, D. & Klinger, M.. *Pretransplantation cellular alloreactivity is predictive of acute graft rejection and long term graft function in kidney transplant*. (O-64 - **Oral Presentation** Kościelska-Kasprzak, K)

2009 Trilateral Czech-German-Polish Symposium "Young Investigator Forum", 23-24 October, 2009, Prague, Czech Republic. Kościelska-Kasprzak, K. and **Drulis-Fajdasz, D.**, Kamińska, D., Mazanowska, O., Krajewska, M., Bieniecki, W., Chudoba, P., Polak, W., Patrzałek, D., Klinger, M.. *ELISPOT as a tool to assess pre-transplant cellular alloreactivity predictive of acute graft rejection and long term graft function in kidney transplant recipients.* (lecture 8 – **Oral Presentation)**

2011 2nd International conference on Transplantomics and Biomarkers in Organ Transplant, 13-15 March, 2011, Barcelona, Spain. Kamińska, D., Kościelska-Kasprzak, K., **Drulis-Fajdasz, D.**, Hałoń A., Polak, W., Chudoba, P., Janczak D., Mazanowska, O., Patrzałek, D., Klinger, M.: *Kidney ischemic injury genes expressed after donor brain death are predictive for kidney transplantation outcome*. (P-014 – **Poster**)

2011 2011 American Transplant Congress, April 30-May 4, 2011. Philadelphia, Pennsylvania, USA. D. Kamińska D., Kościelska-Kasprzak K., **Drulis-Fajdasz D.,** Hałon A., Polak W., Chudoba P., Janczak D., Mazanowska O., Patrzalek D., Klinger M.. *Elimination of Warm Ischemia Affects Renal Allograft Function as Well as Kidney Tissue Gene Expression*. Special Issue:2011 American Transplant Congress: American Journal of Transplantation, Volume 11, Supplement 2, 2011, Oral Abstract 33, p. 38, ISSN 1600-6135, https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03533.x. (**Oral Presentation** Kamińska D.)

Konferencje:

2007 „Najnowsze trendy w metodach biologii eksperymentalnej – proteomika i metody fluorescencyjne", WFBE, Szklarska Poręba, 25-27 maja, 2007.

2008 Bio-Forum VII "Biotechnology and Biobusiness Trade Fair", 15-16 May , 2008, Łódź, Poland.

5.4. Etap IV (od 2010-2025): Praca na stanowisku adiunkta, Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, pod opieką prof. Dariusza Rakusa.

Niniejszy wniosek o przyznanie habilitacji składam w oparciu o dorobek naukowy, który jest efektem pracy na aktualnym stanowisku pracy, czyli w Zakładzie Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej (**Etap IV** kariery zawodowej). Ze względu na to, iż tematyka i zakres technik eksperymentalnych znacząco odbiegał od moich wcześniejszych zainteresowań naukowych (Etap I – III: m.in. szeroko pojęte oddziaływania biało-białko, enzymologia, immunologa, zagadnienia kliniczne z nefrologii i transplantologii), moim głównym wyzwaniem po rozpoczęciu pracy na aktualnym stanowisku, było zdobycie nowych umiejętności, które pozwoliły mi na prowadzenie badań kolejno w projektach realizowanych w zakładzie prof. Dariusza Rakusa (szczegółowo w Rozdziale 4).

Ponadto przez ostatnie 15 lat pracy podejmowałam współprace z naukowcami różnych instytucji, by zdobywać wiedzę i umiejętności oraz budować zespoły projektowe, dla efektywnej realizacji powierzanych mi zadań badawczych z tematyki neurobiologii i metabolizmu komórki. Poniżej przytaczam grupy badawcze oraz projekty wspólnie realizowane, które przyniosły już bardzo wymierny efekt publikacyjny, jak również te, których efekty dopiero mają swój potencjał i są w fazie rozwojowej, by w przyszłości zaowocować w nowe osiągnięcia naukowe.

Krajowe staże naukowe zrealizowane poza Uniwersytetem Wrocławskim – Etap nr IV:

- **długoterminowe** w laboratorium:
  - prof. Jerzego Mozrzymasa (**3.5 roku** - **od lutego 2011 do lipca 2014** – dwa projekty naukowe związane z pomiarami elektrofizjologicznymi, barwieniami i obrazowaniem tkanki nerwowej).
- **krótkoterminowe** w laboratorium:
  - prof. Jakuba Włodarczyka: **dwa tygodniowe pobyty** oraz kilka **dni pomiarowych** (**styczeń 2015 i czerwiec 2018** – obrazowanie kolców dendrytycznych; **październik 2022** – pomiary elektrofizjologiczne i pomiary behawioru, **maj 2024** - analiza palmitylacji).
  - prof. Arkadiusza Miążka: **3 tygodnie** w zwierzętarni Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej przy PAN (**kwiecień/maj 2018** - dla testów behawioralnych); **6 tygodni** w zwierzętarni przy Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Centrum Inżynierii Genetycznej (**kwiecień/maj 2022** - procedury na zwierzętach, **lipiec/sierpień 2023** - testy behawioralne).

Projekty i zadania zostały opisane odpowiednio poniżej. Staże naukowe oraz wymierne efekty współpracy z jednostkami spoza Uniwersytetu Wrocławskiego, są potwierdzone w poświadczeniach dołączonych jako Załącznik nr 8 do wniosku o habilitację.

Tematy badawcze Etap nr IV:

od 2010: **Współpraca z grupą prof. Jerzego Mozrzymasa** (Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu). W ramach współpracy odbyłam **długoterminowy staż naukowy (3.5 roku)** w laboratorium, gdzie jako wykonawca projektów miałam okazję po raz pierwszy wdrożyć się w zagadnienia neurobiologii i techniki pomiarów elektrofizjologicznych aktywności komórek nerwowych. Zdobyte doświadczenie umożliwiło przeprowadzenie samodzielnych badań w późniejszych etapach pracy (tu szczególny ukłon w stronę **dr hab. Tomasza Wójtowicza** i naszej wieloletniej współpracy z zakresu pomiarów elektrofizjologicznych).

Realizowane projekty naukowe i dydaktyczne w trakcie długoterminowego stażu naukowego (od lutego 2011 – do lipca 2014) – poświadczenie w Załączniku nr 8:

- projekt ministerialny Akademii Medycznej we Wrocławiu: „***Mechanizmy molekularne udziału metaloprotein w plastyczności synaptycznej w hipokampie***" (kierownik prof. Jerzy Mozrzymas; GR-755/2011). (czas realizacji: 2011 – 2015);
- projekt ministerialny Uniwersytetu Wrocławskiego: „***Regulacja plastyczności synaptycznej poprzez metabolizm energetyczny astrocytów***" (kierownik prof. Dariusz Rakus, Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski (4476/PB/12/11); zrealizowany przy współpracy z prof. Jerzym Mozrzymasem. (czas realizacji: 2011 - 2015);
- ponadto przy współpracy z prof. Mozrzymasem opracowałam nowe kursy dydaktyczne z zakresu neurobiologii, które zostały uruchomione w programie studiów kierunku Genetyka i Biologia Eksperymentalna na Uniwersytecie Wrocławskim (dokładny opis w Rozdziale 6).

od 2015: **Współpracy z grupą prof. Jakuba Włodarczyka** (Pracownia Biofizyki Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie (IBD PAN Nencki)). Wymiernym efektem wieloletniej wymiany doświadczeń i wzajemnego wsparcia naukowego, są wspólne publikacje, doniesienia konferencyjne, realizowane wspólne granty (dorobek naukowy, o którym tu mowa, jest szczegółowo opisany w Rozdziale 4 oraz w Załączniku 4 do wniosku habilitacyjnego). Na przestrzeni lat 2015 - 2024 odbyłam kilka **krótkoterminowych staży naukowych** w IBD PAN Nencki, w czasie których realizowałam pomiary behawioru myszy, pomiary elektrofizjologiczne i obrazowanie mikroskopii konfokalnej dla morfologii kolców dendrytycznych.

W ramach wymiany know-how miałam również przyjemność współpracować z innymi grupami/osobami Instytutu Nenckiego w Warszawie, gdzie szczególnie chciałabym wspomnieć **prof. Małgorzatą Węsierską** oraz **dr Adama Krzystyniaka**, dzięki którym zdobyłam wiedzę i umiejętności w dziedzinie testów behawioralnych.

Realizowane projekty naukowe w trakcie krótkoterminowych staży (styczeń 2015, czerwiec 2018, październik 2022, maj 2024) - poświadczenie w Załączniku nr 8:

- projekt ministerialny Uniwersytetu Wrocławskiego: „***Regulacja plastyczności synaptycznej poprzez metabolizm energetyczny astrocytów***" (kierownik prof. Dariusz Rakus, Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski (4476/PB/12/11). (czas realizacji: 2011 - 2015);

- projekt finansowany przez Narodowego Centrum Nauki (OPUS 10): *„**Współzależność pomiędzy metabolicznymi czółenkami międzykomórkowymi a makromolekularną organizacją metabolizmu w normie i stanach patologicznych. Ilościowy, jakościowy i funkcjonalny opis nowych celów terapii nowotworów oraz chorób serca i mózgu**.”*; kierownik prof. Dariusz Rakus, Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski (UMO-2015/19/B/NZ1/00332). (czas realizacji 2016 – 2019);
- projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS 19): *„**Regulacja poprzez astrocyty stanu oligomeryzacji fruktozo bisfosfatazy 2 (FBP2) w neuronach jako podstawowy czynnik regulujący tworzenie pamięci i funkcjonowanie mitochondriów**.”*; kierownik prof. Dariusz Rakus, Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski (UMO-2020/37/B/NZ4/00808). (czas realizacji 2021 – 2025).

od 2018: **Współpraca z grupą prof. Arkadiusza Miążka** (Katedra Biochemii i Biologii Molekularne, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu). W ramach współpracy realizowałam zadania z projektów wymienionych poniżej, które dotyczyły procedur na zwierzętach. Badania te były przeprowadzane na terenie zwierzętarni, gdzie przy współpracy z Profesorem i personelem weterynaryjnym, testowano zwierzęta pod kontem zachowania, podawano terapię BAY oraz UM, pobierano materiał biologiczny i przeprowadzano eutanazję zwierząt z pobranie preparatów tkankowych. Procedury zaplanowane obejmowały **2-3 tygodniowe cykle eksperymentów** (**zgonie z uchwałami Wrocławskiej Komisji Etycznej nr: 10/2018; 082/2021/P1; 041/2023**).

Realizowane projekty naukowe podczas sumarycznie 9 tygodni staży naukowych na terenie zwierzętarni Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej przy PAN oraz zwierzętarni przy Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Centrum Inżynierii Genetycznej (kwiecień/maj 2018; kwiecień/maj 2022, lipiec/sierpień 2023) - poświadczenie w Załączniku nr 8:

- projekt finansowany przez Narodowego Centrum Nauki (OPUS 10): *„**Współzależność pomiędzy metabolicznymi czółenkami międzykomórkowymi a makromolekularną organizacją metabolizmu w normie i stanach patologicznych. Ilościowy, jakościowy i funkcjonalny opis nowych celów terapii nowotworów oraz chorób serca i mózgu**.”*; kierownik prof. Dariusz Rakus, Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski (UMO-2015/19/B/NZ1/00332). (czas realizacji 2016 – 2019);
- projekt w ramach Subwencji na Utrzymanie i Rozwój Potencjału Badawczego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu: "***Wstępna ocena farmakokinetyki oraz działania przeciwnowotworowego inhibitora wiązania aldolazy A z cytoszkieletarną aktyną***"; kierownik prof. Piotr Dzięgiel, Zakład Histologii I Embriologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu. (czas realizacji 2021 - 2022);
- projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS 19): *„**Regulacja poprzez astrocyty stanu oligomeryzacji fruktozo bisfosfatazy 2 (FBP2) w neuronach jako podstawowy czynnik regulujący tworzenie pamięci i funkcjonowanie mitochondriów**.”*; kierownik prof. Dariusz Rakus, Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski (UMO-2020/37/B/NZ4/00808). (czas realizacji 2021 – 2025).

od 2021: **Współpraca z grupą prof. Piotra Młynarza** (Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Chemii, Politechnika Wrocławska). Jako promotor pomocniczy pracy doktorskiej Natalii Pudełko-Malik (promotor prof. Piotr Młynarz). Zrealizowano mi.in. wspólnie projekt stanowiący podstawę dysertacji doktorantki, który związany jest tematycznie i metodologicznie z badaniami prowadzonymi przeze mnie na Uniwersytecie Wrocławskim, pt: ***"Zastosowanie podejścia metabolomicznego do analizy zmian plastyczności synaptycznej w oparciu o mysi model zwierzęcy oraz neuronalne pierwotne linie komórkowe"***. Współpraca ta zaowocowała ponadto licznymi nagrodami dla doktorantki, doniesieniami naukowymi i publikacjami. M.in. w ramach współpracy zdobyto: Finansowanie projektu pod patronatem Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) oraz finansowanie projektu pod patronatem Kosciuszko Foundation Exchange Program to the United States (dokładny opis w Załączniku 4, Rozdział 4). Dodatkowo projekt doktorantki i wyniki zostały docenione w latach 2020 – 2023 nagrodami we wrocławskim środowisku akademickim: trzykrotnie Nagrody Rektora Politechniki Wrocławskiej (za osiągnięcia naukowe); dwukrotnie stypendium doktorskie w zwiększonej wysokości (za osiągnięcia naukowe); Laureat konkursu Primus, przy Politechnice Wrocławskiej za wysoko publikowaną pracę naukową.

Za przychylnością prof. Młynarza zostałam włączona w poczet członków Polskiego Towarzystwa Metabolomicznego w 2024r. Dorobek publikacyjny i doniesienia konferencyjne, które bezpośrednio wynikają z w.w. współpracy, a które stanowią m.in. podstawę niniejszego wniosku, zostały ujęte w Rozdziale 4 oraz w Załączniku 4 do wniosku habilitacyjnego wszędzie tam, gdzie pojawiają się nazwiska prof. Piotra Młynarza i Natalii Pudełko – Malik.

od 2011: **Współpraca z grupą prof. Piotra Dzięgla** (Zakład Histologii I Embriologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu). Wieloletnia współpraca wymiany know-how pomiędzy grupą prof. Piotra Dzięgla i prof. D. Rakusa oraz prof. Arkadiusza Miążka, zaowocowała w oficjalnym projekcie: 2021-2022, projekt w ramach Subwencji na Utrzymanie i Rozwój Potencjału Badawczego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu: ***"Wstępna ocena farmakokinetyki oraz działania przeciwnowotworowego inhibitora wiązania aldolazy A z cytoszkieletarną aktyną";*** kierownik prof. Piotr Dzięgiel. Jako główny wykonawca po stronie Uniwersytety Wrocławskiego, byłam odpowiedzialna za pierwszy etap badań - przygotowanie materiały biopsyjnego z zwierząt. Otrzymane wyniki są podstawą do uzyskania patentu – postępowanie w toku (zgłoszenie patentowe nr PK/11649/RW).

od 2023: **Współpraca z grupą dr Stanisława Deja** (University of Texas Southwestern Medical Center, Burgess Lab, Dallas, USA; aktualnie jako lider UTSouthwestern Medical Center, Center for Human Nutrition/Department of Biochemistry, Deja Lab, Dallas, USA https://labs.utsouthwestern.edu/deja-lab). To rozdział działalności naukowej, który rozpoczął się w ramach moich obowiązków względem doktorantki Natalii Pudełko-Malik. Dwa opracowane plany badawcze zostały uznane i zdobyły finansowanie zewnętrzne, co pozwoliło na zrealizowanie wyjazdów zagranicznych doktorantki w ramach:

- Projektu pod patronatem Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA), w ramach którego zrealizowano 3-miesięczny staż naukowy doktorantki w University of Texas Southwestern Medical Center (2023, Burgess Lab, dr Stanisław Deja: ***„Analysis of metabolic flexibility between astrocytes and neurons using stable isotope-labeled tracers and GC-MS"***; Dallas, USA) oraz
- Projektu pod patronatem Kosciuszko Foundation Exchange Program to the United States, W ramach którego zrealizowano 5-miesięczny staż naukowy doktorantki w University of Texas Southwestern Medical Center (2024/2025, Burgess La, dr Stanisław Deja: ***„GC-MS target metabolomic analysis in the concept of glycogenolysis inhibition and memory formation"***; Dallas, USA).

Efektem tej współpracy są wyniki zawarte w publikacjach i wystąpieniach konferencyjnych, m.in. przypisanych jako dorobek naukowy doktorantki z zakresu analiz dotyczący pomiarów metabolomicznych przy zastosowaniu modelu pierwotnych linii komórkowych. Aktualnie Natalia Pudełko-Malik została przyjęta na stanowisku post-dock w ww. grupie badawczej i m.in. będzie kontynuować badania, które zostały zapoczątkowane podczas jej doktoratu na Politechnice Wrocławskiej oraz przy współpracy z Uniwersytetem Wrocławskim.

2010-2025: **Pozostała współpraca instytucjonalna:**

Ponadto chciałabym wymienić instytucje i osoby, z którymi realizowałam moje projekty badawcze, z obopólną korzyścią w postaci szeroko pojętego rozwoju naukowego, dorobku publikacyjnego oraz procesu budowania i rozwijania relacji zawodowych, który ma na celu wymianę informacji, zasobów oraz wzajemne wspieranie się w rozwoju kariery (tzw. **networkingu**).

- **Max-Planck Ins. For Biochemistry Monachium**, Niemcy (prof. Jacek W. Wiśniewskim, analizy proteomiczne).

- **Centrum Badań Omicznych**, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu (dr Kinga Gostompska-Pampuch, analizy proteomiczne).

- **Łukasiewicz PORT we Wrocławiu**
  - Grupa Badawcza Synaptogenezy, dr hab. Tomasz Prószyński, jako promotor pomocniczy pracy doktorskiej Joanny Sadlak-Budy;
  - Grupa Badawcza Biologii Astrocytów, dr Michał Ślęzak, wymiany know-how i organizacji międzynarodowych konferencji: Neuronus (Kraków, 2022), 16-ego Kongresu PTBUN (Toruń, 2023) oraz Neuronus (Kraków 2024).

- **Centrum NanoBioMedyczne UAM** (CNBM UAM, Poznań, prof. Jan Barciszewski, badania zmian na poziomie genomu).

- **Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej** im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu (Laboratorium Wirusologii, dr hab. Beata Orzechowska, analizy na liniach komórkowych).

- **Department of Microbiology and Immunology**, Brody School of Medicine at East Carolina University Greenville, USA (prof. James A McCubrey – zagadnienia GSK3β).

Dodatkowy dorobek Etap nr IV

czyli wynikający ze współpracy i staży naukowych poza jednostką macierzystą, lub z udziału w projektach innych niż ten który jest podstawą do wniosku o habilitację - dorobek **Etap nr IV**, który nie zostały wcześniej ujęty w Rozdziale 4.

Publikacje:

2012 Wiera G, Wójtowicz T, Lebida K, Piotrowska A, **Drulis-Fajdasz D**, Gomułkiewicz A, Gendosz D, Podhorska-Okołów M, Capogna M, Wilczyński G, Dzięgiel P, Kaczmarek L, Mozrzymas JW. Long term potentiation affects intracellular metalloproteinases activity in the mossy fiber-CA3 pathway. Mol Cell Neurosci. 2012 Jun;50(2):147-59. doi: 10.1016/j.mcn.2012.04.005. Epub 2012 Apr 25. Erratum in: Mol Cell Neurosci. 2013 Jan;52:181-2. PMID: 22555058.

2018 **Drulis-Fajdasz D**, Rakus D, Wiśniewski JR, McCubrey JA, Gizak A. Systematic analysis of GSK-3 signaling pathways in aging of cerebral tissue. Adv Biol Regul. 2018 Aug;69:35-42. doi: 10.1016/j.jbior.2018.06.001. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29958836.

2018 Duda P, Wiśniewski J, Wójtowicz T, Wójcicka O, Jaśkiewicz M, **Drulis-Fajdasz D**, Rakus D, McCubrey JA, Gizak A. Targeting GSK3 signaling as a potential therapy of neurodegenerative diseases and aging. Expert Opin Ther Targets. 2018 Oct;22(10):833-848. doi: 10.1080/14728222.2018.1526925. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30244615.

2020 Hajka D, Duda P, Wójcicka O, **Drulis-Fajdasz D,** Rakus D, Gizak A. Expression of Fbp2, a Newly Discovered Constituent of Memory Formation Mechanisms, Is Regulated by Astrocyte-Neuron Crosstalk. Int J Mol Sci. 2020 Sep 20;21(18):6903. doi: 10.3390/ijms21186903. PMID: 32962293; PMCID: PMC7555702.

2025 Pudelko-Malik N, **Drulis-Fajdasz D,** Fydryszewski M, Burgess S, Mlynarz P, Rakus D, Deja S. Glucose-dependent metabolism of hippocampal primary neurons in response to chemically induced long-term potentiation. **bioRxiv [Preprint].** 2025 Feb 25:2025.02.24.639988. doi: 10.1101/2025.02.24.639988. PMID: 40060682; PMCID: PMC11888351.

2025 Turlej E, Domaradzka A, Radzka J, **Drulis-Fajdasz D,** Kulbacka J, Gizak A. Cross-Talk Between Cancer and Its Cellular Environment-A Role in Cancer Progression. Cells. 2025 Mar 10;14(6):403. doi: 10.3390/cells14060403. PMID: 40136652; PMCID: PMC11940884.2025

Wystąpienia/komunikaty konferencyjne:

2011 Society for Neuroscience Conference, 12-16 November, 2011, Washington, USA. Wiera, G., Wojtowicz, T., Lebida, K., **Drulis-Fajdasz, D**., Wawrzyniak, M., Michaluk, P., Dziegiel, P., Kaczmarek, L., Mozrzymas, J.W.. Maintenance of long-term potentiation in hippocampal mossy fiber - CA3 pathway requires optimal balance of matrix metalloproteinase 9 activity. (H2 449.06 – **Poster**)

2011 10th International Congres of the Polish Neuroscience Society, 21-24 September, 2011, Łódź, Poland. Wójtowicz T., Gendosz D., Lebida K, **Drulis-Fajdasz D**., Wiera G., Capogna M., Wilczyński G., Dzięgiel P., Mozrzymas J.W.. Induction of long term potentiation in DG - CA3 hippocampal pathway results in increased MMP-2/9 gelatinolysis in target hilar and CA3 neurons. (P2.25 – **Poster**)

2013 Federation of European Neuroscience Societies (FENS) - The Neurobiology of Synapses and their Dysfunction, 13-17 October, 2013, Stresa, Italy. Drulis-Fajdasz D., Mozrzymas J.W., Rakus D.. Synaptic plasticity affects the expression level of glycogen and glucose metabolism enzymes in neurons and astrocytes. (11 – Poster)

2014 NEURONUS 2014 IBRO & IRUN Neuroscience Forum, 25-27 April, 2014, Krakow, Poland. Drulis-Fajdasz D., Wawrzyniak M., Włodarczyk J., Mozrzymas J.W., Rakus D.. Inhibition of glycogen metabolism in astrocytes positively influence on the synaptic plasticity in old rats. (Oral Presentation- Dominika Drulis-Fajdasz)

2014 V Sympozjum Współczesna Myśl Techniczna w Naukach Medycznych i Biologicznych, 20-21 czerwca, 2014, Wrocław, Poland. Drulis-Fajdasz D., Wawrzyniak M., Włodarczyk J., Mozrzymas J.W., Rakus D.. Zastosowanie technik elektrofizjologicznych i mikroskopowych w analizie zmian plastyczności synaptycznej. (Oral Presentation- Dominika Drulis-Fajdasz)

2016 BIO 2016 - 2nd Congress of Polish Biochemistry, Cell biology, Biotechnology and Bioinformatics "Expanding beyond the limits", 13-16 September, Wrocław, Poland. Drulis-Fajdasz D., Wójtowicz T., Mozrzymas J.W., Rakus D.. Lactate: a fuel for aging brain? (Poster)

2018 3rd Congress of Polish Biosciences BIO2018 and the 51st Meeting of the Polish Biochemical Society, 18-21 September 2018, Gdańsk, Poland. Drulis-Fajdasz D., Krzystyniak A., Miążek A., Zalas M., Włodarczyk J., Rakus D.. Glycogen phosphorylase inhibition – a new fountain of youth. (Poster)

2019 44th FEBS CONGRESS, 6-11 July 2019, Krakow, Poland From Molecules to Living Systems. Drulis-Fajdasz D., Pytyś A., Krzystyniak A., Bączyńska E., Włodarczyk J., Miążek A., Barciszewska A., Giel-Pietraszuk M.. Glycogen phosphorylase inhibition – new anti¬aging approach? (P¬24¬027 – Poster)

2021 ChemBiotic Chemistry & Biotechnology International Conference, 24-25 June 2O21, Wrocław, Polska. Pudełko- Malik N., Drulis-Fajdasz D., Rakus D., Młynarz P.. Comparative metabolomic analysis in mice brain regions by IH NMR spectroscopy. (Poster)

2021 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 13-17 września 2021, Łódź, Polska. Pudełko- Malik N., Drulis-Fajdasz D., Rakus D., Młynarz P.. Porównawcza analiza metabolomiczna odrębnych obszarów mózgu myszy za pomocą spektroskopii 1H NMR - myszy młode vs, myszy stare. (Poster)

2021 The 8th Conference of Polish Metabolomic Society Metabolomjcs Circle 2021, 17-19 November 2O21, Katowice, Polska. Pudełko-Mallk N., Młynarz P., Rakus D., Drulis-Fajdasz D.. Metabolomic fingerprinting - analysis of tissue mouse brain depending on age. (Poster)

2022 25th IUBMB Congress, the 46th FEBS Congress and the 15th PABMB Congress (FEBES 2022), 9-14 July 2022, Lizbon, Portugal. Drulis-Fajdasz D., Krzystyniak A., Gostomska-Pampuch K., Wiśniewski J. R., Pudełko-Malik N., Wiśniewski J. Ł., Miążek A., Młynarz P., Rakus D.. Inhibition of glycogen phosphorylase counteracts age-related defects in memory formation. (2022-ShT-01.5-1 Short Talk) (Oral Presentation- Dominika Drulis-Fajdasz)

2022 The 12th International Scientific Conference NEURONUS 2022 Neuroscience Forum, 15-17 October 2022, Kraków, Polska. Pudełko-Malik N., Drulis-Fajdasz D., Rakus D., Młynarz P. Monitoring metabolite profiles depending on aging processes – Metabolomics approaches. (Oral Presentation Natalia Pudełko-Malik)

2022 XI Sympozjum Współczesna Myśl Techniczna w Naukach Medycznych i Biologicznych, 18-19 November 2022, Wrocław, Polska; Drulis-Fajdasz D., Rakus D.. Hamowanie fosforylazy glikogenu przeciwdziała związanym z wiekiem defektom w tworzeniu pamięci. (Oral Presentation- Dominika Drulis-Fajdasz)

2022 XI Sympozjum Współczesna Myśl Techniczna w Naukach Medycznych i Biologicznych, 18-19 November 2022, Wrocław, Polska. Pudełko-Malik N., Drulis-Fajdasz D., Rakus D., Młynarz P.. Analiza profili metabolomicznych w zależności od wieku – podejście metabolomiczne. (Oral Presentation Natalia Pudełko-Malik)

2023 The 9th Conference of Polish Metabolomic Society Metabolomjcs Circle 2023, 26-28 January 2023, Wrocław, Poland. Drulis-Fajdasz D., Pudełko-Malik N., Młynarz P. and Rakus D.. Age-related memory formation defects are accompanied by the metabolic profil. (Invited Lecture - Dominika Drulis-Fajdasz)

2023 The 9th Conference of Polish Metabolomic Society Metabolomjcs Circle 2023, 26-28 January 2023, Wrocław, Poland. Pudełko-Malik N., Drulis-Fajdasz D., Rakus D., Młynarz P.. Development and validation of a fast, selective and sensitive LC-MS method for quantification of glycogenolysis phosphorylase inhibitor (BAY U6751) in mouse tissues. (Oral Presentation Natalia Pudełko-Malik)

2023 XI Sympozjum Współczesna Myśl Techniczna w Naukach Medycznych i Biologicznych, 29-30 września 2023, Wrocław, Polska. Budziak B., Hinc P., Domaradzka A., Pietras Ł., Basiak K., Hajka D., Drulis-Fajdasz D., Czogalla A., Gizak A., Rakus D.. Interakcje różnych form fruktoso-1,6-bisfosfataxzy z HIF1. (Oral Presentation Budziak B).

2023 16th International Congress of the Polish Neuroscience Society (PTBun), 20-23 September 2023, Toruń, Poland. Drulis-Fajdasz D., Pudełko-Malik N., Gostomska –Pampuch K., Wiśniewski J. R., Młynarz P. and Rakus D.. Age-related decline in memory formation is accompanied by the changes in proteomic and metabolic profile (S7.4). (Invited Lecture- Dominika Drulis-Fajdasz)

2023: The 8th Warsaw Conference on Perspective of Molecular Oncology, 7-8 September 2023, Warsaw, Poland. Pudełko-Malik N., Drulis-Fajdasz D., Rakus D., Młynarz P. 1H NMR – based metabolomics approaches, revealed a metabolic phenotype in mouse brain regions depending on aging processes. (Poster)

2024 The 6th Advances in Pharmaceutical Analysis and 10th Conference of Polish Metabolomic Society Metabolomics Circle (APA 2024 and MetCircle 2024), 14-16 November 2024, Łódź, Poland. Drulis-Fajdasz D., Pudełko-Malik N., Młynarz P. and Rakus D.. Rejuvenation of old animals by inhibiting glycogen breakdown. (Invited Lecture - Dominika Drulis-Fajdasz)

2024 Wykład audytoryjny na zaproszenie pt.: „Jak poznajemy mechanizmy pamięci", dla Uniwersytet Trzeciego Wieku (UTW) przy Uniwersytecie Wrocławskim. (Wykład audytoryjny na zaproszenie- Dominika Drulis-Fajdasz)

2024 The 14th International Scientific Conference NEURONUS 2024 Neuroscience Forum, 25-27 April 2024, Kraków, Poland. Pudełko-Malik N., Drulis-Fajdasz D., Rakus D., Młynarz P.. Exploring Post-Translational modifications in the context of neuronal plasticity. (Oral Presentation Natalia Pudełko-Malik)

2025 BioLOCK, 06-07 June 2025, Wroclaw, Poland. Pudełko-Malik N., Drulis-Fajdasz D., Rakus D., Młynarz P.. Glycogenolysis inhibition enhances cognitive function and alters brain metabolism in aging mice: behavioral and metabolomic evidence. (Invited Lecture Natalia Pudełko-Malik)

2025 XIV Sympozjum "Współczesna Myśl Techniczna w Naukach Medycznych i Biologicznych" 26-27 września 2025 r., Wrocław, Polska. Betlej P., Pietras Ł., Drulis-Fajdasz D., Gizak A., Rakus D.. Regulacja dynamiki mitochondriów przez oligomeryczne formy FBPasy2 w fibroblastach płucnych. (Poster)

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

Ze względu na to, iż od 15 lat jestem na stanowisku adiunkta na uczelni wyższej, nieodzownym elementem mojej codziennej pracy jest prowadzenie grupowych zajęć dydaktycznych oraz opieka indywidualna na studentami. Miałam okazję realizować szereg kursów na wydziale Nauk Biologicznych UWr oraz na Wydziale Biotechnologii UWr, dla różnych roczników i kierunków (specjalizacji). Dzięki tak dużemu doświadczeniu dydaktycznemu i ciągłemu podnoszeniu kwalifikacji w tym zakresie (opis poniżej), kursy przez ze mnie prowadzone, cieszą się dużym zainteresowanie studentów, którzy chętnie wybierają przygotowane przeze mnie programy przedmiotów do wyboru, obejmujące zarówno ćwiczenia, jak i wykłady.

Zaufanie bezpośredniego przełożonego, który promuje samodzielność swoich pracowników, umożliwiło mi wprowadzenie do programu studiów szereg przedmiotów autorskich oraz autorską modyfikację przedmiotów już obecnych w programie, tak by dostosować realizowany program do najnowszych doniesień naukowych, czy narzędzi dydaktycznych. W **Rozdziale 6.1** podsumowuję tematykę zajęć dydaktycznych przeze mnie prowadzonych, ich ramy czasowe oraz wykaz sumarycznych godzin dydaktycznych wypracowanych w ramach pensum na Uniwersytecie Wrocławskim.

6.1. Dydaktyka w ramach pensum na Uniwersytecie Wrocławskim.

Zajęcia prowadzone przez ze mnie są realizowane głównie dla Wydziału Nauk Biologicznych, kierunku Genetyka i Biologia Eksperymentalna, ale również dla kierunku Biotechnologia, Ochrona Środowiska, Biologia: zoologia, Biologia: biologia nauczycielska. Corocznie ilość godzin dydaktycznych przekracza wymogi mojego pensum, nie licząc dodatkowego obciążenia dydaktycznego w laboratorium, wynikającego z opieki promotorskiej nad eksperymentalnymi pracami licencjackimi i magisterskimi oraz jako promotor pomocniczy dla prac doktorskich.

Podsumowując, dla zajęć regularnych wpisanych w program studiów, moje doświadczenie jako nauczyciel akademicki obejmowało w latach: **214h** (2010-2011), **209h** (2011/2012), **232h** (2012/2013), **290h** (2015/2016), **275h** (2016/2017), **322h** (2017/2018), **335h** (2018/2019), **353h** (2019/2020), **345h** (2020/2021), **369h** (2021/2022), **280h** (2022/2023), **246h** (2023/2024), **267h** (2024/2025). – sumarycznie w ramach etatu na UWr przeprowadziłam 3282 godziny dydaktyczne zajęć regularnych i opieki nad dyplomantami.

Zakres tematyczny kursów przeze mnie przygotowanych lub zredagowanych i corocznie aktualizowanych, obejmuje: fizjologię zwierząt, metabolizm, biofizykę, biologię i chemię białek, techniki laboratoryjne, oraz coraz szerzej omawiane zagadnienia z neurobiologii, na zróżnicowanym poziomie poruszanych zagadnień i aspektów metodologicznych wykorzystywanych z analizie funkcji kognitywnych. Poniżej spis zajęć przeze mnie prowadzonych w akademickich cyklach dydaktycznych:

od 2010/2011

- Ćwiczenia „Fizjologia zwierząt" (30 h);
- Pracownia specjalizacyjna „Techniki badawcze w biologii eksperymentalnej" (laboratorium dla licencjuszy, stosownie do projektów prac);
- Seminarium „Problematyka nauk biologicznych" (laboratorium dla dyplomantów stosownie do projektów prac);

od 2013/2014

- Autorskie seminarium „Neurobiologia komórkowa" (kurs 10 h);

od 2016/2017

- Autorskie ćwiczenia „Wstęp do neurobiologii" (kurs 10 h);
- Autorski wykład „Białka w technikach laboratoryjnych" (kurs 15 h);
- Autorskie ćwiczenia „Białka w technikach laboratoryjnych" (kurs 30 h);

od 2018/2019

- Autorski wykład „Molekularne, komórkowe i behawioralne korelaty pamięci" (kurs 15 h);
- Autorskie konwersatorium „Molekularne, komórkowe i behawioralne korelaty pamięci" (kurs 15 h);

od 2019/2020

- Ćwiczenia „Metabolizm komórek zwierzęcych" (kurs 15 h);
- Autorskie zajęcia typu blended do ćwiczeń „Białka w technikach laboratoryjnych" na platformie Moodle, jako kurs w systemie kształcenia na odległość) (kurs 6 h);

od 2020/2021

- Ćwiczenia „Biofizyka" (kurs 10 h);

od 2024/2025

- Autorski wykład „Wstęp do neurobiologii" (kurs 15 h).

6.2. Opieka promotorska.

Ważnym aspektem mojej pracy zawodowej jest indywidualny kontakt ze studentami. Moje doświadczenie obejmuje różnego charakteru opiekę nad jednostkowymi mini-projektami, które dotyczyły prac licencjackich (teoretycznych i eksperymentalnych), prac magisterskich (zawsze eksperymentalnych), stażów naukowych studentów zagranicznych, czy wieloletnich, rozbudowanych projektów prac doktorskich. Poniżej wymieniam najważniejsze z osiągnięć, gdzie zamysł i opracowanie planu pracy oraz monitorowanie jej postępów, czy weryfikacja otrzymanych danych eksperymentalnych, należało o moich obowiązków, a które otrzymały uznanie u osób trzecich i zakończyły się sukcesem.

2010-2025 Opieka nad dyplomantami Uniwersytety Wrocławskiego (16 licencjatów i 9 magisterium, jako promotor oraz 20 licencjatów i 11 magisterium, jako recenzent). Wszystkie z wymienionych wspierały rozwój naukowy (teoretyczny i praktyczny) studentów wykonujących prace w tematyce i metodologii, bliskiej mojej jednostki macierzystej (Zakładowi Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, UWr) – dyplomy ocenione bardzo pozytywnie.

2019/2020 Promotor półrocznego stażu magistrantki Raquel Gil Bardaji (Hiszpania) w ramach programu wymiany studenckiej ERASMUS, projekt pt.: „Reactive oxygen species (ROS) as a marker of stress in cultured brain cells, induced by glycogen phosphorylase inhibitor." – staż zrealizowany.

2020-2025 Promotor pomocniczy dla doktorantki Natalii Pudełko-Malik (Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Wydział Chemii, Politechnika Wrocławska, promotor prof. Piotr Młynarz, temat: "Zastosowanie podejścia metabolomicznego do analizy zmian plastyczności synaptycznej w oparciu o mysi model zwierzęcy oraz neuronalne pierwotne linie komórkowe." – przyznany stopień naukowy doktora z wyróżnieniem, czerwiec 2025. – obrona pracy z wyróżnieniem.

od 2021 Promotor pomocniczy dla pracy doktorskiej Joanny Sadlak-Budy (Sieć Badawcza Łukasiewicz – PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii, promotor dr hab. Tomasz Prószyński, temat: „Badanie funkcji białka Amotl1 w ośrodkowym układzie nerwowym" – w trakcie realizacji.

2022 Koordynator wniosku na Nagrodę Rektora za wybitne osiągnięcia naukowe związane z realizacją rozprawy doktorskiej uzyskane w roku akademickim 2022/2023, jako promotor pomocniczy doktorantki Natalii Pudełko-Malik – nagroda przyznana.

2023 Promotor pomocniczy w projekcie Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA), w ramach którego zrealizowano projekt i 3-miesięczny staż doktorantki Natalii Pudełko-Malik w University of Texas Southwestern Medical Center (Dallas, USA) – stypendium przyznane.

2023 Koordynator wniosku na Studencki Program Stypendialny, realizowany przez Wrocławskie Centrum Akademickie z inicjatywy Prezydenta Miasta Wrocławia – wyróżnienie przyznane.

2023 Koordynator wniosku na Program Stypendialny Kosciuszko Foundation (The Kosciuszko Foundation Grants) na rok akademicki 2024/2025 – 6 miesięczne stypendium na pobyt doktorantki w University of Texas Southwestern Medical Center (Dallas, USA) – stypendium przyznane.

6.3. Organizacja konferencji.

Uważam, że konferencje to nie tylko okazja do prezentacji swoich badań i wyników, ale również okazja do integracji osób zaangażowanych w jej przygotowanie, dlatego od czasów studenckich angażowałam się w tego rodzaju wydarzenia naukowe. Oczywiście początkowo, byłam odpowiedzialna za sprawy organizacyjne (wyszczególnione w Załączniku 4 do wniosku), ale z upływem czasu moje obowiązki zaczęły obejmować kwestie naukowe, co uważam za swego rodzaju uznanie w środowisku naukowym. Dlatego też w Autoreferacie chciałabym pokreślić swoje zaangażowanie w organizację paneli tematycznych (minisymposium) na jednej z najbardziej rozpoznawalnych konferencji międzynarodowy w tematyce neurobiologii organizowanych w Polsce. Byłam odpowiedzialna za zgłoszenie tematyki, zaproszenie wykładowców i finalnie prowadzenie całego panelu na konferencji.

2022 Organizacja symposium w ramach The 12th International Scientific Conference NEURONUS 2022 Neuroscience Forum, 15-17 October 2022, Kraków, Poland; session name: **Markers of Aging** *(1. Circulating microRNAs as early biomarkers in Alzheimer's and other aging related diseases; 2. Monitoring metabolite profiles depending on aging processes – metabolomics approaches; 3. Western diet as a trigger of Alzheimer's disease: from metabolic syndrome to neurodegeneration; 4. Senolytic treatment changes age associated cognitive decline and elevated peripheral inflammation in aged but not young male Wistar rats.)* **(Chairman)**

2024 Organizacja symposium w ramach The 13th International Scientific Conference NEURONUS 2024, Neuroscience Forum, 25-27 April 2024, Kraków, Poland; session name: **Molecular Mechanisms of Synaptic Plasticity** *(1. Stress resilience is an active and multifactorial process manifested by structural, functional, and molecular changes in synapses; 2. PSD-95-dependent synaptic transmission in the dorsal CAI area (dCA1) of the hippocampus is required for updating, but not formation, of contextual memories; 3. The effect of swimming on the synaptic plasticity in the somatosensory cortex of ALS mice model; 4. Journey through development to maturation in brain organoids: how far can we get?)* **(Chairman)**

2025 member of the Scientific Committee of the 2nd Science Conference BioLOCK 2025 (6-7 June 2025, Wroclaw, Poland) **(Chairman)**

6.4. Koło naukowe.

Wyjątkowym doświadczeniem organizacyjnym od 2024 r., w którym mam okazję realizować nowe zadania, jest opieka nad Studenckim Kołem Naukowym Genetyków i Biologów Eksperymentalnych „CORTEX". Moje czynne uczestnictwo w działalności Koła to m.in. całodniowa wizyta w Centrum Nauki Kopernika organizowana przy współpracy z Iloną Iłowiecką-Tańską (Zastępca Dyrektor Programowej ds. Innowacji, CNK) oraz dr Klaudią Żerańską (kierownik Działu Laboratoriów, CNK) (05.05.2025). Spośród innych aktywności koła (opisanych na stronie Facebook „SKN Cortex") szczególnym wydarzeniem była organizacja konferencji BioLock (6-7.06.2025, Wrocław, Polska), przy współpracy z kołem naukowym Wydziału Biotechnologii na Uniwersytecie Wrocławskim (SKN Przybysz).

6.5. Popularyzacja nauki:

Miałam okazję dzielić się swoją wiedzą i doświadczeniem w pracy laboratoryjnej podczas wydarzeń popularyzujących naukę wśród odbiorców bardzo zróżnicowanych wiekowo - uczniowie szkół średnich vs. członkowie Uniwersytetu Trzeciego Wieku:

2007 Dolnośląski Festiwal Nauki (DNF), panel „Nowoczesna medycyna na poziomie komórkowym w nefrologii i medycynie transplantacyjnej", organizowany w Klinice Nefrologii u Medycyny Transplantacyjnej, Akademii Medycznej we Wrocławiu - ćwiczenia praktyczne w laboratorium pt.: „Komórki układu odpornościowego – ocena w laboratorium"

2023 Artykuł na stronie Uniwersytetu Wrocławskiego:Naukowcy UWr pomagają zatrzymać proces starzenia - Uniwersytet Wrocławski (https://uwr.edu.pl/naukowcy-uwr-pomagaja-zatrzymac-proces-starzenia/)

2023 Artykuł popularyzatorski na stornie „Nauka w Polsce" (naukawpolsce.pl):Badanie na myszach: możemy farmakologicznie odmłodzić mózg | Nauka w Polsce (https://naukawpolsce.pl/aktualnosci/news%2C97988%2Cbadanie-na-myszach-mozemy-farmakologicznie-odmlodzic-mozg.html)

2023 artykuł na stornie „Polska Nauka" (polishscience.pl):Naukowcy Uniwersytetu Wrocławskiego pomagają zatrzymać proces starzenia | Polska Nauka (https://polishscience.pl/pl/naukowcy-uniwersytetu-wroclawskiego-pomagaja-zatrzymac-proces-starzenia/

2023 nota w social media:(20+) Massive, massive breakthrough thanks to Prof.... - Kera Statuch Blake | Facebook

2024 Wykład audytoryjny pt.: „Jak poznajemy mechanizmy pamięci", na zaproszenie dla Uniwersytet Trzeciego Wieku (UTW) przy Uniwersytecie Wrocławskim.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Jako kwestie ważne, które niewątpliwie wspierały rozwój mojej kariery zawodowej, to dbałość o ciągłe poszerzanie swoich zainteresowań, podnoszenia swoich kompetencji i zakresu umiejętności (twardych i miękkich). Dlatego też w Rozdziale 7.1 przedstawiam tematykę kursów dodatkowych (organizowanych przez pracodawcę lub instytucje zewnętrzne), które zawsze podejmowałam z własnej inicjatywy, a które niewątpliwie przyniosły wymierne korzyści w przebiegu mojej pracy zawodowej.

7.1. Szkolenia i podnoszenie kompetencji:

Swój rozwój zawodowy sukcesywnie wspierałam (i będę wspierać) poprzez uczestnictwo w różnego rodzaju szkoleniach, które obejmowały zarówno zagadnienia dotyczące metodologii badawczej, czy obsługi aparatury pomiarowej, jak i zagadnienia dotyczące aspektów naukowych (doszkalające). Jedne z najważniejszych jest zdobycie doświadczenia w pracy ze zwierzętami, co umożliwiło mi m.in. na samodzielne przeprowadzenie wszystkich testów behawioralnych, omówionych w moich pracach oryginalnych (Rozdział 4).

Jako nauczyciel akademicki aktywnie podejmuję propozycje szkoleń oferowanych przez moją uczelnię macierzystą, które pozwalają na systematyczne podnoszenie moich kwalifikacji w prowadzeniu zajęć dydaktycznych i umiejętności interpersonalnych w kontaktach ze studentami. Na szczególne wzmiankę zasługuje rozbudowane szkolenie tworzenia materiałów dydaktycznych i kursów do nauki asynchronicznej w systemie e-learningu (na platformie Moodle) oraz niedawno ukończony kurs Tutoringu (2024), który przygotował mnie do podjęcia nowej formy pracy indywidualnej z tzw. Tutii – w systemie pracy jeden na jeden oraz w aktywizacji studentów podczas zajęć i miniprojektów.

Zagadnieniem, które może wydawać się trochę pobocznym, acz dla mnie niezmiernie interesującym, jest podnoszenie świadomości aspektów wdrożeniowych wśród pracowników naukowych i naukowo – dydaktycznych, stąd moje uczestnictwo w szkolenie InBit, gdzie nauka spotyka się z biznesem.

Poniższa lista szkoleń została uszeregowane względem poruszanych zagadnień: szkolenia metodologiczne, szkolenia naukowe, szkolenia dla nauczycieli akademickich oraz szkolenia o charakterze Science-to-business (S2B).

Szkolenia metodologiczne:

2006 "Basic Course in Laboratory Skills and Advance Training in Organ Transplantation" organized by European Society of Organ Transplantation (ESOT): "Hands-on-Course in Laboratory Techniques", October 29 – November 3, 2006, Rotterdam, Holland. Held at the Transplantation Laboratory of the Erasmus Medical Center Rotterdam, Holland.

2008 "Real-time PCR School" held on Applied Biosystems Polish Office, 21-22 October 2008, Warsaw, Poland.

2009 "Operator Training in FACSCalibur™Flow Cytometer CellQuest PRO software v. 6.0.2", 24-26 February 2009, Akademia Medyczna, Wroclaw, Poland

od 2010 Aktualne szkolenie oraz wyznaczenia do planowania, uczestniczenia i przeprowadzania procedur na zwierzętach (dla gryzoni) na Uniwersytecie Wrocławskim, Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu oraz w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

Szkolenia naukowe:

2006/2007 Podyplomowa Szkoła Nefropatii, kurs do specjalizacji w nefrologii klinicznej (nr 5-752-02-218-2007 na liście centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie), wydany prze Wydział Lekarski Kształcenia Podyplomowego Akademii Medycznej im. Piastów Śl. we Wrocławiu, Dolnośląska Izba Lekarska, Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej AM – (zaświadczenie nr 2007/90/46 z dnia 26.06.2007).

2013 "Autumn Training School – COST BM1003", Faculty of Biological Science, University of Wroclaw, 23-25 September, 2013, Wrocław, Poland. "The advantages and limitations of methods used in bacteria identification and typing" (12 h).

2016 „Genome Technology Course" w ramach funduszu "Scientiae Wratislavienses", Instytut Genetyki I Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski (24 h), 5-11 maja 2016, Wrocław, Polska.

Szkolenia dla nauczycieli akademickich:

2018/2019 **Cykl szkoleń w ramach projektu: „DOBRA KADRA – podniesienie kompetencji kardy dydaktycznej Uniwersytetu Wrocławskiego na rzecz wzmocnienia jakości kształcenia na uczelni" oraz prowadzonych przez Centrum Kształcenia na Odległość (CKO przy Uniwersytecie Wrocławskim):**

- E-learning w pracy dydaktycznej (18 h);
- Praca dydaktyczna z użyciem metody WebQuest (4 h);
- Wykorzystanie narzędzi MS Office 365 w dydaktyce (8 h);
- Platforma Moodle dla początkujących (3 h)
- Platforma Moodle dla zaawansowanych (3 h);
- Innowacyjne technologie edukacyjne (4 h);
- Digital storytelling (4 h).

2022 Szkolenie UE w ramach projektu „Uniwersytet Wrocławski uczelnią w pełni dostępną do roku 2023" w ramach umowy POWR.03.05.00-00-A006/19 „Szkolenie z zakresu kontaktu ze studentami z zaburzeniami za spectrum autyzmu" (8 h) (certyfikat nr 2022/SDZP/UW/11/04).

2023 Szkolenie na Uniwersytecie Wrocławskim " Zasady postępowania w przypadku osób w kryzysie psychicznym" - warsztaty psychologiczne dla nauczycieli akademickich UWr (8 h).

2024 **Kurs dla nauczycieli akademickich prowadzony w Akademii Tutoringu Kolegium Międzydziedzinowych Studiów Indywidualnych Uniwersytetu Wrocławskiego** (80 h). **Tutoring jest metodą dydaktyczną opartą na indywidualnej relacji mistrz-uczeń, o elastycznych formach organizacji pracy dydaktycznej.**

2025 Mikro-poświadczenie – kurs dla nauczycieli akademickich prowadzonych prze Centrum Kształcenia na Odległość przy Uniwersytecie Wrocławskim „Multimedia w dydaktyce akademickiej" (20 h).

2025 Szkolenie realizowane jest w ramach programu SOS (Sekurak o Security) zagadnienia związane z bezpieczeństwem w sieci, w ramach szkoleń dla pracowników Uniwersytety Wrocławskiego (15 modułów tematycznych).

Szkolenia o charakterze Science-to-business (S2B):

2013 Szkolenie pt.: **„Ekspert ds. projektów badawczo–rozwojowych" w ramach projektu KREATORZY INNOWACJI, POKL. Priorytet IV Szkolnictwo wyższe i nauka, Działanie 4.2 „Rozwój kwalifikacji kadr systemu B+R i wzrost świadomości roli nauki w rozwoju gospodarczym", organizowany przez Instytut Organizacji Przedsiębiorstw i Technik Informacyjnych InBIT Sp. z o.o.** (126 h), 22.02.2013 - 25-05.2013, Wrocław, Szczecin, Gliwice.

7.2. Nagrody.

Wniosek o przyznanie habilitacji chciałabym uzupełnić o wykaz zdobytych nagród indywidualnych i grupowych, jako potwierdzenie uznania recenzentów i środowiska naukowego mojego wkładu w rozwój nauk ścisłych i edukacji na uczelni wyższej.

2006 ESOT Basic Science Network Travel Grant, z którego finansowany był pobyt szkoleniowy "Hands-on-Course in Laboratory Techniques" organizowany przez European Society for Organ Transplantation (ESOT).

2012 Nagroda zespołowa „Za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej", przyzna za cykl prac z transplantacji nerek, Rektor Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, prof. dr hab. Marek Ziętek.

2012-2013 Stypendium szkoleniowe InBit tzw. projekt KREATORZY INNOWACJI, w ramach programu Unii Europejskiej "KAPITAŁ LUDZKI - nowa strategia spójności". Szkolenie, którego ideą jest nabycie praktycznej wiedzy dotyczącej realizacji prac badawczo – rozwojowych, w tym zasad komercjalizacji i ochrony własności intelektualnej, przygotowującej do samodzielnego opracowania strategii wdrażania innowacji.

2017 Nagroda Rektora Uniwersytety Wrocławskiego za osiągnięcia dydaktyczne uzyskane w 2016 roku.

2018 Nagroda Rektora Uniwersytety Wrocławskiego za osiągnięcia organizacyjne uzyskane w 2017 roku.

2020 Nagroda Rektora Uniwersytety Wrocławskiego za osiągnięcia dydaktyczne i organizacyjne uzyskane w 2019 roku.

2022 Uznanie w II edycji konkursu "Projakościowy sposób wynagradzania nauczycieli akademickich" na dodatki motywacyjne jednorazowe w ramach programu "Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza" (IDUB), Uniwersytet Wrocławski.

2021 Nagroda Jubileuszowa Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego za 20-letni staż pracy.

2021 Uznanie w I edycji konkursu "Projakościowy sposób wynagradzania nauczycieli akademickich" na dodatki motywacyjne jednorazowe w ramach programu "Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza" (IDUB), Uniwersytet Wrocławski.

2022-2024 Uznany przez Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego dodatek motywacyjny, w związku z realizacją projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki (OPUS 19): „Regulacja poprzez astrocyty stanu oligomeryzacji fruktozo bisfosfatazy 2 (FBP2) w neuronach jako podstawowy czynnik regulujący tworzenie pamięci i funkcjonowanie mitochondriów.", kierownik prof. Dariusz Rakus, Uniwersytet Wrocławki (UMO-2020/37/B/NZ4/00808).

2024 Uznanie pełnego dofinansowania dla 80h kursu w Akademii Tutoringu Kolegium Międzydziedzinowych Studiów Indywidualnych Uniwersytetu Wrocławskiego, ze środków Prorektora ds. nauczania przy UWr.

2025 Uznanie w I edycji konkursu „Premia za publikację" w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza" (IDUB), Uniwersytet Wrocławski.