

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Rada Dyscypliny Nauki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Borowska 211, 50-556 Wrocław

za pośrednictwem:

Rady Doskonałości Naukowej

pl. Defilad 1

00-901 Warszawa

(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Dr Adriana Kubis-Kubiak
Katedra i Zakład Toksykologii Wydziału Farmacji
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Wniosek

z dnia 27 września 2023

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie¹ nauki farmaceutyczne.

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

Analiza mechanizmów patofizjologicznych leżących u podstaw progresji choroby Alzheimer'a ze szczególnym uwzględnieniem wpływu zaburzeń metabolicznych.

Wnioskuje – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 zm.) – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu **tajnym/jawnym***²

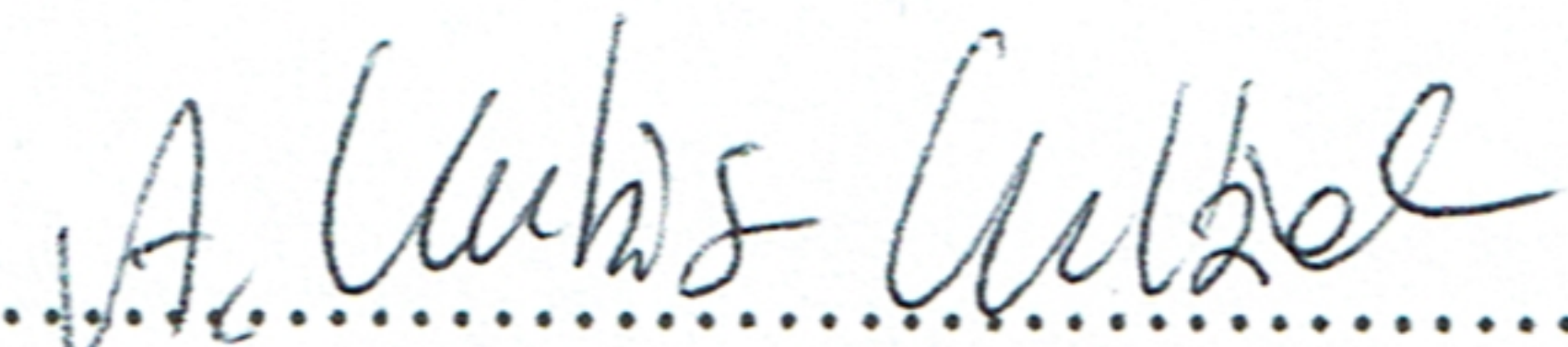
Zostałem poinformowany, że:

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

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art.

232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

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

.....

(podpis wnioskodawcy)

Załączniki:

¹ Klasyfikacja dziedzin i dyscyplin wg. rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1818).

² * Niepotrzebne skreślić.

1. Dane wnioskodawcy
2. Autoreferat
3. Dokumenty dodatkowe
4. Wykaz osiągnięć naukowych labo artystycznych
5. Oświadczenia współautorów



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Dr Adriana Kubis-Kubiak

Autoreferat

Katedra i Zakład Toksykologii
Wydział Farmacji Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

Wrocław 2023

Spis treści

1.	Imię i nazwisko	3
2.	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania.....	3
3.	Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4.	Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.....	4
4.1.	Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4.2.	Wykaz opublikowanych artykułów stanowiących osiągnięcie naukowe.....	4
4.3.	Wprowadzenie w tematykę badawczą cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego ...	7
4.4.	Omówienie celu naukowego oraz wyników prac stanowiących podstawę wszczęcia postępowania habilitacyjnego.....	9
	Cel główny	9
	Cele szczegółowy – analiza oraz charakterystyka biochemicznych procesów leżących u podstaw współistnienia AD z T2DM.	9
	Cele szczegółowy – Analiza i charakterystyka potencjalnych nowych biomarkerów rozwoju AD u pacjentów w współistniejącą cukrycą typu 2.	13
	Cel szczegółowy - Optymalizacja i charateryzacja komórkowego modelu badawczego stosowanego w badaniach łączących zaburzenia metaboliczne zachodzące w komórkach tkanki nerwowej z patogenezą zmian neurozwyrodnieniowych u osób w podeszłym wieku	17
	[P3].....	17
	Cel szczegółowy - Analiza roli białka S100B w korelacji ze stresem oksydacyjnym i nitrozowym w zaburzonej homeostazie glukozy/insuliny w zróżnicowanych komórkach linii PC12.	21
	Cel szczegółowy – białka S100B oraz S100A8 jako mediatory zaburzeń metabolicznych występujących w neuronach dopaminergicznych.	24
	Cel szczegółowy – Ocena wpływu A β ₄₀ oraz A β ₂₅₋₃₅ na proliferację, poziom H ₂ O ₂ , A β ₄₂ , S100A8, S100B, protrużnię neuronów i neurogenezę w warunkach hyperinsulinemii i glikemii.....	29
4.5.	Podsumowanie głównych wyników opisanych w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe.....	32
5.	Informacje o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej wraz z omówieniem pozostałego dorobku z okresu całej kariery zawodowej.	36
5.1.	Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora wraz z informacją o współpracach krajowych i międzynarodowych.	36
5.2.	Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora wraz z informacją o współpracach krajowych i międzynarodowych.	39
	Pozostałe publikacje oryginalne i prace przeglądowe	48
	Udział w międzynarodowych lub krajowych konferencjach naukowych	50
	Współpraca naukowa wewnętrzna	51
	Współpraca naukowa zewnętrzna.....	52
	Udział w projektach badawczych.....	53
	Staże badawczo-naukowe	54
	Nagrody i stypendia za działalność naukową.	55
	Recenzje prac naukowych.	56
	Kursy i szkolenia.....	56
6.	Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.	58
6.1.	Działalność dydaktyczna	58
6.2.	Działalność organizacyjna	61
6.3.	Działalność popularyzatorska	61
7.	Inne informacje	61
8.	Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego habilitanta.....	62

1. **Imię i nazwisko.**

Adriana Kubis-Kubiak

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania.**

- 2000 r. — dyplom ukończenia studiów pierwszego stopnia i uzyskanie stopnia licencjata biotechnologii na podstawie pracy dyplomowej pt.: „Zastosowanie inhibitorów proteinaz w terapiach wybranych jednostek chorobowych” wykonanej w Laboratorium Biotechnologii Białek Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Antoniego Polanowskiego
- 2002r - dyplom ukończenia studiów drugiego stopnia i uzyskanie stopnia magistra biotechnologii na podstawie pracy dyplomowej pt "Izolacja białek o niskiej masie cząsteczkowej z siary owczej" wykonanej w Laboratorium Biotechnologii Białek Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Antoniego Polanowskiego
- 2008 r. - dyplom i stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii uzyskany na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Właściwości regulatorowe kompleksu PRP - Kolostryniny® i jej składnika nonapeptydowego. Modulacja różnicowania i funkcji linii komórkowych oraz fibrilogeneza peptydu Aβ₄₂" wykonanej w Laboratorium Biotechnologii Białek Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego; we współpracy w Laboratorium Immunochemii, Katedry Chemii Ogólnej, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk.

3. **Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

- 2002 - 2003 wolontariusz w Laboratorium Immunochemii, Katedry Chemii Ogólnej, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk.
- 2003 - 2008 - doktorant dziennych studiów doktoranckich w Laboratorium Biotechnologii Białek Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca doświadczalna wykonywana w Laboratorium Immunochemii, Katedry Chemii Ogólnej, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk.
- 2008 - 2013 - stanowisko Post-Doc w Laboratorium Neuropatologii Oddziału Neurologii V, I.R.C.C.S. Narodowy Instytut Neurologiczny "Carlo Besta", Mediolan, Włochy.
- 2014 do chwili obecnej - stanowisko adiunkta w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

- 2016 do chwili obecnej Kierownik Pracowni Toksykologii Molekularnej w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Wydziału Farmacji
4. **Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.**

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Analiza mechanizmów patofizjologicznych leżących u podstaw progresji choroby Alzheimer’a ze szczególnym uwzględnieniem wpływu zaburzeń metabolicznych”

4.2. Wykaz opublikowanych artykułów stanowiących osiągnięcie naukowe

Moim osiągnięciem naukowym, będącym podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego jest cykl 6 powiązanych tematycznie artykułów naukowych (P1-P6), opublikowanych w latach 2019-2023. Sumaryczny Impact Factor przedstawionego cyklu publikacji według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi **31,009** co odpowiada **760** punktom Ministerstwa Edukacji i Nauki. W pięciu pracach przedłożonego cyklu jestem pierwszym autorem zaś w jednej drugim.

P1. Kubis-Kubiak A., Rorbach-Dolata A., Piwowar A. (2019) Crucial players in Alzheimer's disease and diabetes mellitus: friends or foes? Mech. Ageing Dev. 181:7-21. DOI: 10.1016/j.mad.2019.03.008

IF: 4,304 Pkt. MEiN: 100

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współdziałaniu w koncepcji pracy, opracowaniu konspektu artykułu, przeprowadzeniu systematycznego przeglądu piśmiennictwa, analizie literatury, napisaniu manuskryptu artykułu oraz jego korekcie edytorskiej, opracowaniu części graficznej, złożeniu manuskryptu do czasopisma i kontakcie z redakcją czasopisma.

P2. Kubis-Kubiak A., Dyba A., Piwowar A. (2020) The interplay between diabetes and Alzheimer's disease - in the hunt for biomarkers. Int. J. Mol. Sci. 21;8:2744. DOI: 10.3390/ijms21082744

IF: 5,923 Pkt MEiN: 140

Mój indywidualny wkład w powstanie tej publikacji przeglądowej polegał na: propozycji tematyki publikacji, przeglądzie najnowszego piśmiennictwa, analizie danych z piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu pracy oraz opracowaniu piśmiennictwa, ostatecznej edycji oraz

akceptacji końcowej wersji manuskryptu. Jako autor korespondencyjny na złożeniu manuskryptu do czasopisma i kontaktu z redakcją czasopisma oraz z zespołem badawczym przy edycji manuskryptu oraz sformułowaniu odpowiedzi dla recenzentów.

Publikacja została przygotowana w ramach projektu finansowanego ze środków przyznanych przez Ministerstwo Sprawiedliwości Nauki i Szkolnictwa Wyższego w programie "Regionalna Inicjatywa Doskonałości" na lata 2019-2022, projekt numer 016/RID/2018/2019

P3. Wiatrak, B., **Kubis-Kubiak, A.**, Piwowar, A., Barg, E. (2020). PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells*, 9(4), 958. DOI: 10.3390/cells9040958

IF:6.600 Pkt. MEiN: 140

Mój indywidualny wkład w powstanie tej oryginalnej pracy polegał na: współdziałaniu w zdefiniowaniu problemu badawczego, ustaleniu metod, technik i narzędzi badawczych, administrowaniu projektem badawczym a także zarządzaniu danymi, prowadzeniu hodowli linii komórkowej PC12, różnicowaniu linii komórkowej PC12 za pomocą różnych rodzajów i stężeń neuronalnego czynnika wzrostu, wykonaniu barwień immunocytochemicznych Doublecortyną i Anti-NeuN, napisaniu wstępu oraz dyskusji z przeprowadzonych eksperymentów, edycji manuskryptu i sformułowaniu odpowiedzi dla recenzentów.

P4. **Kubis-Kubiak A.**, Wiatrak B, Piwowar A. (2021) The Impact of High Glucose or Insulin Exposure on S100B Protein Levels, Oxidative and Nitrosative Stress and DNA Damage in Neuron-Like Cells. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(11):5526. DOI: 10.3390/ijms22115526

IF:6.208 Pkt. MEiN: 140

Mój indywidualny wkład w powstanie tej oryginalnej pracy polegał na: zdefiniowaniu problemu badawczego, ustaleniu metod, technik i narzędzi badawczych, administrowaniu projektem badawczym a także zarządzaniu danymi, wykonaniu doświadczeń na liniach komórkowych: różnicowaniu linii komórkowej PC12 za pomocą neuronalnego czynnika wzrostu (NGF), oznaczaniu poziomu markerów stresu oksydacyjnego, oznaczaniu oraz analiza poziomu zewnątrz i wewnątrz komórkowego białka S100B, oznaczaniu oraz analizie uszkodzenia dwuniciowego DNA testem FHA, napisaniu wstępu, metodyki, wyników oraz dyskusji z przeprowadzonych eksperymentów. Jako autor korespondencyjny na złożeniu manuskryptu do czasopisma i kontaktu z redakcją czasopisma oraz z zespołem badawczym przy edycji manuskryptu.

P5. Kubis-Kubiak A., Wiatrak B., Piwowar A. (2022) Hyper-glycaemia or insulinemia modulates S100B, S100A8, amyloid β 1-40 and 1-42 secretion and induce morphological changes in dopaminergic neurons. *Biomed. Pharmacother.* 156:113869. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113869

IF: 7.419 Pkt MEiN: 100

Mój indywidualny wkład w powstanie tej oryginalnej pracy polegał na: zdefiniowaniu problemu badawczego, ustaleniu metod, technik i narzędzi badawczych, administrowaniu projektem badawczym a także zarządzaniu danymi, prowadzeniu hodowli komórkowej, różnicowaniu linii SH-SY5Y oraz ustaleniu warunków hyperglycemii i insulinemii, oznaczaniu poziomu markerów stresu oksydacyjnego, oznaczaniu poziomu białek: S100B, S100A8, $A\beta_{40}$ oraz $A\beta_{42}$, wykonaniu barwień DAPI oraz immunocytochemicznych: S100B, MAP2, Doublecortyną i NeuN, napisaniu wstępu, metodyki i wyników z przeprowadzonych eksperymentów oraz dyskusji. Jako autor korespondencyjny na złożeniu manuskryptu do czasopisma i kontaktu z redakcją czasopisma oraz z zespołem badawczym przy edycji manuskryptu.

P6. Kubis-Kubiak A., Wiatrak B., Piwowar A. (2023) Comparison of physiological state and conditions imitating the comorbidity of type 2 diabetes with Alzheimer's disease. The impact on: proliferation, H_2O_2 , $A\beta_{42}$, S100A8, S100B levels, neuronal protrusion and neurogenesis. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 2023;80(4) DOI (not registered): 10.32383/appdr/171296 (przyjęta do druku) IF: 0.555 Pkt MEiN: 140

Mój indywidualny wkład w powstanie tej oryginalnej pracy polegał na: zdefiniowaniu problemu badawczego, ustaleniu metod, technik i narzędzi badawczych, administrowaniu projektem badawczym a także zarządzaniu danymi, prowadzeniu hodowli komórkowej, różnicowaniu linii SH-SY5Y oraz oznaczaniu poziomu H_2O_2 , S100B, S100A8 oraz $A\beta_{42}$, wykonaniu barwień immunocytochemicznych, napisaniu wstępu, metodyki i wyników z przeprowadzonych eksperymentów oraz dyskusji. Jako autor korespondencyjny na złożeniu manuskryptu do czasopisma i kontaktu z redakcją czasopisma oraz z zespołem badawczym przy edycji manuskryptu.

Mój udział procentowy w powstanie każdego z artykułów stanowiących osiągnięcie naukowe szacuję na przynajmniej 80%.

Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego z nich w ich powstanie.

4.3 Wprowadzenie w tematykę badawczą cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Choroba Alzheimer'a (AD), która stanowi ogromne wyzwanie dla opieki zdrowotnej jak i ze względu na koszty finansowania leczenia czy opieki długoterminowej. Obraz kliniczny AD, w swojej najczęstszej postaci, to głównie: epizodyczne zaburzenia pamięci, deficyty poznawcze, pojawiające się ograniczenia w zachowaniach społecznych; a w zaawansowanych stadiach: problemy z samodzielnym funkcjonowaniem w życiu codziennym. Najczęściej obserwowanym podtypem choroby jest późno rozwijająca się postać z wieloczynnikową etiopatogenezą, zaś około 1-5% przypadków AD to szybko postępująca forma związana z autosomalnymi dominującymi mutacjami genu missense w preseniline 1, preseniline 2 lub białka prekursorowego amyloidu (APP). Wczesne objawy AD są spowodowane dysfunkcją synaptyczną, która zakłóca łączność między obwodami nerwowymi, inicjując w ten sposób postępującą utratę pamięci. Stopniowej degeneracji i śmierci neuronów towarzyszy nagromadzenie patologicznych białek w mózgu. Wewnątrz komórek obserwuje się splątki neurofibrylarne z nieprawidłowo hiper-ufosforylowanym aksonalnym białkiem związanym z mikrotubulami - białkiem tau. Akumulacja splątków neurofibrilarnych w neuronach, upośledza transport aksonalny, zakłóca plastyczność synaptyczną i prowadzi do apoptozy neuronów. Obserwuje się również powstawanie złogów nierozpuszczalnego A β prowadzącego do powstawania blaszek starczych.[1-3] Blaszkki starcze znajdujące się w mózgach pacjentów z AD składają się głównie z nierozpuszczalnych, gęsto upakowanych, toksycznych form A β , które powstają w procesie nieprawidłowego cięcia APP. Naukowcy sugerują, że APP wpływa na procesy takie jak proliferacja i różnicowanie komórek, wzrost neurytów i synaptogenezę.[4-5] Dominującym składnikiem białkowym blaszek starczych jest 4kDa peptyd A β powstający podczas sekwencyjnego rozszczepiania APP, który może tworzyć rozpuszczalne oligomery składające się z amyloidu β 1-40 (A β ₄₀); lub przechodzi zmiany konformacyjne prowadzące do powstawania toksycznych nierozpuszczalnych form (między innymi amyloidu 1-42; A β ₄₂), z których tworzą się włókna a następnie blaszki starcze. Najstarszą hipotezą dotyczącą przyczyny rozwoju AD jest hipoteza cholinergiczna. Opiera się ona na obserwacji niedoboru neuroprzekaźnika jakim jest acetylocholina i związanymi z tym zaburzeniami sygnalizacji w układzie cholinergicznym. Ponadto u osób cierpiących na AD zaobserwowano zmniejszenie aktywności acetylotransferazy choline - enzymu odpowiedzialnego za: syntezę acetylcholine, wzrost butyrylocholinoesterazy i spadek stężenia acetylocholinoesterazy. Główną funkcją acetylocholinoesterazy jest regulacja

przewodzenia impulsów nerwowych poprzez szybką hydrolizę acetylocholiny. Dlatego podstawową formą terapii AD jest stosowanie leków polepszających jakość przewodnictwa w układzie cholinergicznym. Są to leki stymulujące receptory muskarynowe i nikotynowe stymulujące leki czy inhibitory acetylocholinoesterazy. Butyrylocholinoesterazy również uczestniczą w kontroli neurotransmisji, a jej znaczące ilości znajdują się w płytkach starczych, splątkach neurofibrylarnych, a także w dystroficznych komórkach nerwowych w mózgu chorych na AD, co sugeruje, że lepsze efekty leczenia mogą przynieść strategie oparte na hamowaniu samej butyrylocholinoesterazy lub synergistycznie z acetylocholinoesterazą.[6-7]

Zwiększający się odsetek ludzi w podeszłym wieku z zdiagnozowaną cukrzycą typu 2 (T2DM) cierpiących jednocześnie na choroby o podłożu neurodegeneracyjnym stymuluje do poszukiwania związków między tymi dwoma odrębnymi jednostkami chorobowymi. Schorzenia te mają pewne wspólne cechy, ponieważ obie mają długie fazy prodromalne i są przewlekłymi, złożonymi jednostkami chorobowymi. Podczas gdy dla AD nie istnieje jeszcze skuteczna terapia prowadząca do pełnego wyzdrowienia, w leczeniu T2DM dostępnych jest wiele środków farmakologicznych. Co więcej, AD jest zaburzeniem głównie pojedynczego narządu - mózgu, z drugiej strony T2DM charakteryzuje się wielonarządowym uszkodzeniem. Chociaż na pierwszy rzut oka te dwa schorzenia wydają się nie mieć ze sobą wiele wspólnego to jednak upośledzona sygnalizacja insulinowa, przewlekła hiperglikemia, glukotoksyczność, zaburzenia mechanizmu sygnalizacji kinazy syntazy glikogenu 3β , nagromadzenie zaawansowanych produktów końcowych glikacji (AGE) czy dysfunkcja mitochondriów mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie zarówno AD, jak i w powikłaniach cukrzycowych.[8] Wiele publikacji naukowych wskazuje iż upośledzona sygnalizacja insuliny może przyczyniać się do rozwoju AD, prowadząc do wniosku, że jest to w rzeczywistości choroba neuroendokrynną.[9-10] Co więcej, AD można uznać za "zaburzenie mózgu" związane z sygnalizacją insuliny, której towarzyszy stan niedoboru insuliny w mózgu i/lub przewlekła insulinooporność, przy jednoczesnym braku mechanizmu autoimmunologicznego zniszczenia komórek beta wysp trzustkowych.. Ponieważ funkcje poznawcze i pamięć, metabolizm i wychwytywanie glukozy w mózgu są regulowane przez insulinę, nieprawidłowe działanie jej sygnalizacji prowadzi do braku równowagi energetycznej objawiającej się wytwarzaniem reaktywnych form tlenu, uszkodzeniem DNA czy dysfunkcją mitochondriów. W konsekwencji aktywowane są kaskady proapoptyczne i prozapalne oraz patologiczne rozszczepienie APP prowadzące do powstania toksycznych form $A\beta$. [11-12] Oprócz wpływu zaburzeń metabolizmu glukozy, niektórzy naukowcy sugerują, iż upośledzenie funkcji poznawczych można zaobserwować po knock-out'cie insu-

liny w modelu *in vivo* cukrzycy wywołanej przez domózgowe (ic.) wstrzyknięcie streptozotocyny.[13] Co ciekawe, szczury te nie wykazywały zmian w morfologii czy metabolizmie zachodzącym w komórkach β trzustki ani nie zaobserwowano hiperglikemii, ale stwierdzono apoptozę, glejozę i podwyższoną immunoreaktywność między innymi białka fosfo-tau i $A\beta$. Badania te potwierdzają hipotezę o ważnej roli glukozy i insuliny w rozwoju AD.

4.4. Omówienie celu naukowego oraz wyników prac stanowiących podstawę wszczęcia postępowania habilitacyjnego

Cel główny

Głównym celem podjętych przeze mnie badań, opisanych w pracach składających się na osiągnięcie habilitacyjne, było analiza mechanizmów patofizjologicznych leżących u podstaw progresji AD ze szczególnym uwzględnieniem wpływu zmian metabolicznych obserwowanych w T2DM. Wspólne cechy molekularne i komórkowe wspierają hipotezę AD jako specyficznej formy cukrzycy mózgu o nazwie "cukrzyca typu 3" zaproponowanej przez grupę de la Monte w 2005 roku.[15] Spośród wspólnych cech AD i T2DM, ta, która najprawdopodobniej będzie czynnikiem etiologicznym w AD, jest zmniejszona reakcja komórkowa na insulinę. Stan insulinooporności mózgu wydaje się być wczesną i powszechną cechą u ludzi z AD.[16] Istnieje związek między cukrzycą a demencją, ale dane dotyczące konkretnych mechanizmów jego realizacji są niewystarczające, a czasem sprzeczne.[2,17,18]

Dla tych badań sformułowałam szczegółowe cele badawcze:

Cele szczegółowy – analiza oraz charakterystyka biochemicznych procesów leżących u podstaw współistnienia AD z T2DM.

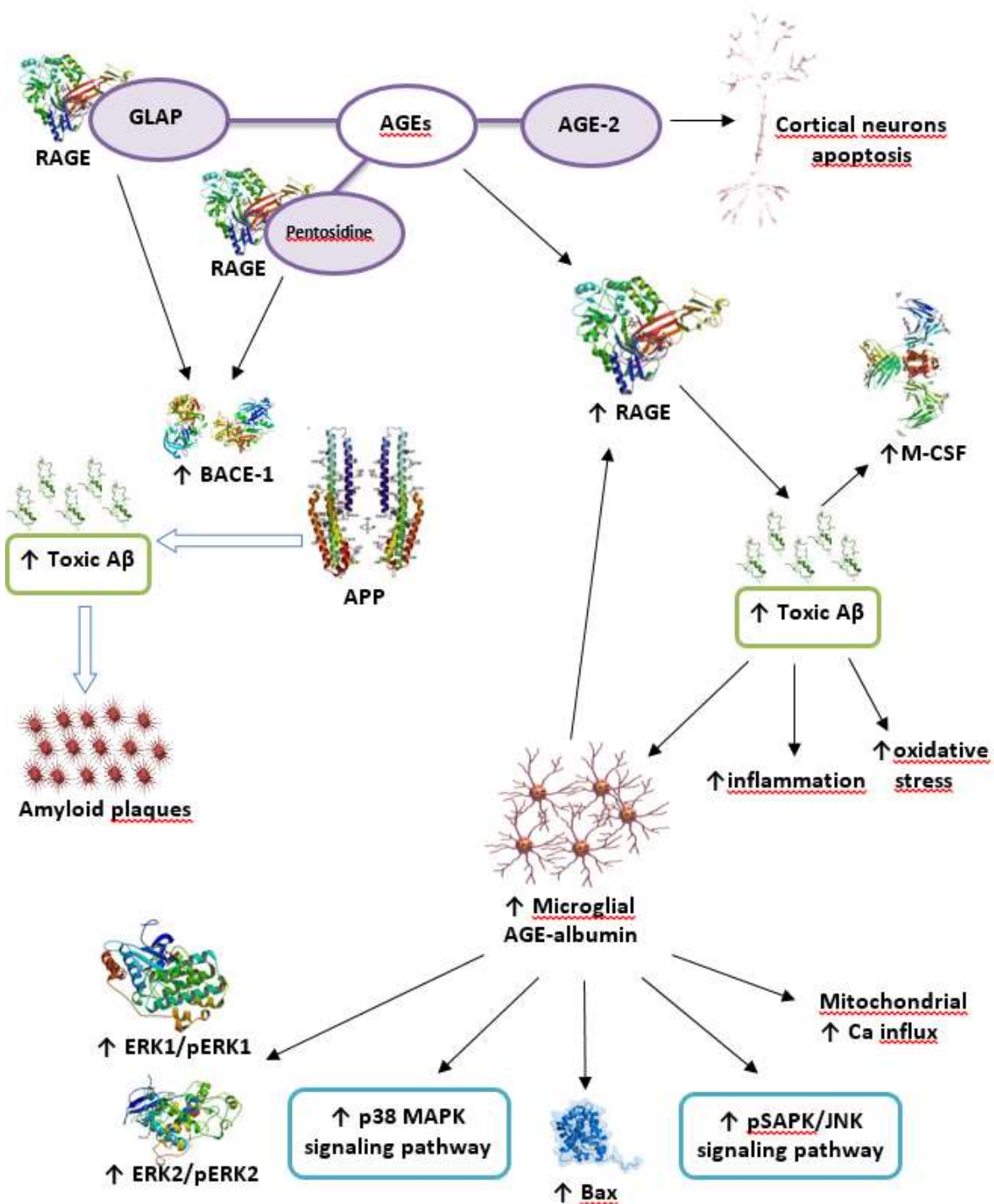
[P1] Kubis-Kubiak A., Rorbach-Dolata A., Piwowar A. (2019) Crucial players in Alzheimer's disease and diabetes mellitus: friends or foes? *Mech. Ageing Dev.* 181:7-21

Celem tego artykułu było przedstawienie kompleksowego przeglądu dowodów łączących T2DM z początkiem i rozwojem AD oraz zwrócenie uwagi na nieznane lub słabo zbadane szlaki leżące u podstaw tej koegzystencji. Starzejące się populacje narażone na choroby neurodegeneracyjne i jednocześnie zaburzenia metaboliczne, takie jak otyłość czy T2DM; stawiają ogromne wyzwania zarówno ekonomiczne jak i przed służbą zdrowia. Oprócz wskazania możliwych biomarkerów wczesnego rozpoznania T2DM i AD, niniejsza publikacja przeglądowa była również próbą odpowiedzi na pytanie - czy kluczowe czynniki rozwoju obu schorzeń przemawiają za związkiem między cukrzycą a AD? W publikacji tej podsumowałam dowody

wskazujące na możliwe powiązania między tymi dwoma schorzeniami oraz zwróciłam uwagę na wciąż mało poznane nakładanie się czynników i szlaków odpowiedzialnych za zaburzenia neurodegeneracyjne, które mogą jednocześnie odgrywać kluczową rolę w przewlekłej hiperглиkemii. W pracy tej zaanalizowałam wpływ cukrzycy na proces powstawania A β , białka tau oraz ich patologicznych modyfikacji. Skupiłam się głównie na roli insuliny i jej receptorów, znaczeniu podwyższonego stężeniu glukozy i AGE w osoczu oraz ich wpływie na metabolizm A β i białka tau. Na początku opisałam współwystępowanie przewlekłej hiperглиkemii wraz ze zmianami neuropatologicznymi. W warunkach fizjologicznych trzustka aktywuje produkcję insuliny bezpośrednio po posiłku, co indukuje wychwyt glukozy z krwi i promuje glikogenezę poprzez nasilenie glukoneogenezy i hamowanie syntezy glukozy. Nieprawidłowe funkcjonowanie komórek β trzustki wynika z tworzenia i agregacji amylin lub polipeptydu amyloidu ludzkich wysp trzustkowych (hIAPP).[19,20] Proces ten jest dodatkowo przyspieszany przez glukotoksyczne uszkodzenia komórek β trzustki, które są silnie podatne na niekorzystne zmiany wywołane silną hiperглиkemią, a zwłaszcza ze względu na niską aktywność układów antyoksydacyjnych. Co ciekawe, struktura molekularna i morfologia włókienek hIAPP przypomina fibryle A β w AD. W ciągu ostatniej dekady wiele badań potwierdziło koncepcję, że AD reprezentuje chorobę metaboliczną z subklinicznymi objawami w mózgu, takimi jak deficyty w wykorzystaniu glukozy prowadzące do upośledzenia funkcji poznawczych.[21-23] W badaniu Hisayama zasugerowano, że cechy histopatologiczne AD są związane z cukrzycą lub insulinoopornością. Analiza kowariancji i regresji logistycznej wykazała związek hiperглиkemii i hiperinsulinemii ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia blaszek starczych. Biorąc pod uwagę tło genetyczne, wariant epsilon 4 genu apolipoproteiny E zwiększał ryzyko tworzenia się blaszek starczych.[24] Stwierdzono też znacznie zmniejszona liczbę blaszek starczych i splątków neurofibrylarnych w korze mózgowej i hipokampie u chorych na cukrzycę.[25,26] Natomiast agregacja A β była większa u nieleczonych pacjentów chorych na T2DM oraz AD, podczas gdy liczba mikronaczyniowych zawałów była wyższa u pacjentów z otępieniem, którym podawano lek na cukrzycę.[27-28] W przeprowadzonych badaniach na zwierzęcych modelach stanu przedcukrzycowego (szczury BBZDR/Wor) zaobserwowano, iż fosforylacja białka tau i akumulacja A β wydają się być skorelowane z insulinoopornością i hipercholesterolemią.[29-30] Ponadto cukrzyca stymuluje rozwój AD poprzez wzmacnianie stanu zapalnego naczyń krwionośnych prowadzące do poważnych deficytów pamięci i upośledzenia funkcji poznawczych.[30-31]

Następnie scharakteryzowałam wpływ insuliny na metabolizm A β i białka tau. Istnieje kilka hipotez na temat możliwej roli zaburzeń poziomu insuliny w rozwoju procesów neuropatologicznych. Hiperinsulinemia obwodowa może wywoływać sygnał, który hamuje syntezę insuliny w tkance mózgowej. Sugeruje się również, że niskie stężenia insuliny w mózgu mogą zmniejszyć uwalnianie A β , a tym samym przyspieszyć jego akumulację. Inna hipoteza zakłada, że konkurencja między A β a insuliną o enzym rozkładający insulinę powoduje agregację A β ze względu na jego wyższe wydzielanie i spowolniony proces usuwania z tkanki nerwowej. Inna teoria łączy wysoki poziom insuliny z aktywacją nadwrażliwości neuronów na toksyczne formy A β i ufosforylowanego białka tau.[8] O ile stężenia glukozy i insuliny w tkankach obwodowych i mózgowych są kluczowe dla zrozumienia zależności między cukrzycą a AD, o tyle powstaje pytanie o sposoby transportu glukozy przez barierę krew-mózg i jego zależności od metabolizmu insuliny. Wstępne badania potwierdziły koncepcję, że transportery glukozy - GLUT1 i GLUT3, a także wychwyt glukozy w mózgu nie są zależne od insuliny.[32] Opisane przeze mnie badania wspierają tezę, iż sama insulinooporność nie jest wystarczająca do rozwoju zauważalnych zmian neurodegeneracyjnych, ale ułatwiają i przyspieszają proces hiperfosforylacji białka tau jak i neurofilamentów, a co za tym idzie, powstawaniu splątków neurofibrylarnych.[33-34] Potencjalną korelację pomiędzy metabolizmem glukozy a szlakami odpowiedzialnymi za powstawanie A β czy białka tau opisałam w kolejnym rozdziale publikacji. Wpływ toksycznego działania hiperglikemii na cechy patologiczne AD może być różny u poszczególnych pacjentów w zależności od czasu trwania i nasilenia hiperglikemii. W prospektywnym badaniu kohortowym grupa Larsona wykazała, że wyższe poziomy glukozy mogą odgrywać rolę przyczynową w zwiększonym ryzyku rozwoju demencji i skłonności do progresji z łagodnego upośledzenia poznawczego do AD.[3,35] Zwykle w mózgu zwiększenie wychwyty glukozy jest procesem saturacyjnym, po którym następuje podwyższenie aktywności receptorów dla insuliny. Gdy aktywność receptora jest hamowana, może to spowodować trwałą hiperglikemię. Z drugiej strony, jeśli homeostaza między poziomem glukozy wchodzącej do mózgu a stężeniem insuliny zostanie zaburzona, może to prowadzić do nagromadzenia AGE. Jednorazowa aplikacja insuliny poprawia zdolności poznawcze, podczas gdy długotrwałe podawanie może pogarszać te umiejętności, aktywować insulinooporność, procesy zapalne i hiperglikemię. Ponadto może zmniejszać wrażliwość bariery krew-mózg na insulinę, a tym samym wpływać na metabolizm glukozy w mózgu.[36] Rolę stężenia glukozy w tkance mózgowej i ocenę przepływu glikolitycznego na nasilenie progresji AD jak i ekspresję objawów badała grupa Thambisetty.[37] Wykazali oni, że niski poziom neuronalnego transportera glukozy

GLUT3 odzwierciedla większe nasilenie zarówno powstawiania płytek starczych, jak i patologii splotków neurofibrylarnych. Ponadto wzrost poziomu glukozy w osoczu na czczo wiąże się z wyższym poziomem glukozy w mózgu.[24] W kolejnym rozdziale podsumowałam dostępną wiedzę z zakresu prawdopodobnego wpływu AGE na metabolizm A β oraz białka tau. Poniżej na rysunku nr. 1 prezentuje potencjalny mechanizm wzajemnych powiązań między A β a AGE i ich receptorami (RAGE).



Rys. 1 Potencjalny mechanizm współzależności między beta-amyloidem a AGE/RAGE.

AGEs- produkty końcowe zaawansowanej glikacji; AGE-2 - produkt końcowy zaawansowanej glikacji 2; RAGE- receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji; GLAP- pirydyna pochodząca z aldehydu glicerynowego; BACE-1 – beta-sekretaza 1; APP – białko prekursorowe amyloidu; M-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów; A β – amyloid β , ERK1 – kinaza 1 regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym; pERK1 – fosforylowana kinaza zewnątrzkomórkowa regulowana sygnałem 1; ERK2 - kinaza 2 regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym; pERK2 – fosforylowana kinaza zewnątrzkomórkowa regulowana sygnałem 2; pSAPK/JNK- fosforylowana kinaza białkowa aktywowana stresem/c-Jun NH(2)-końcowa kinaza; Bax - białko X związane z chłoniakiem z komórek B 2; p38 MAPK – kinazy białkowe aktywowane mitogenem.

Nadal brakuje bezpośrednich dowodów *in vivo* wskazujących na wpływ AGE na fosforylację białka tau. Pośmiertne badania immunohistochemiczne wykazały znaczący wzrost zarówno komórek dodatnich dla RAGE, jak i wielkości zagregowanych komórek tau-dodatnich w hilusie, komórkach piramidalnych i ziarnistej warstwie hipokampa pacjentów z cukrzycą i AD w porównaniu z pacjentami z AD.[38] Li et al. [39] wykazali, że traktowanie komórek SK-N-SH, neuronów pierwotnych i szczurów z egzogennym BSA zawierającym zmodyfikowane AGE doprowadziły do hiperfosforylacji białka tau poprzez szlak kinazy syntazy glikogenu β 3 za pośrednictwem RAGE. Celowanie w ten szlak może być obiecującą strategią terapeutyczną zapobiegającą hiperfosforylacji białka tau w odpowiedzi na zwiększone poziomy AGE. W ostatnim rozdziale podałam kilka przykładów kierunków badań dla naukowców, które mogą w przyszłości pomóc w wyjaśnieniu procesów leżących u podstaw współzależności cukrzycy z chorobami neuropatologicznymi. Należą do nich:

1. Zbadanie wpływu procesu glikacji białek za pomocą dehydrogenazy aldehydo-3-fosforanowej na zmiany neuropatologiczne charakterystyczne dla chorób neurodegeneracyjnych
2. Rola insuliny/glukozy w zmianach morfologicznych astrogleju i neuronów, takich jak np.: gęstość wypustek neuronalnych, rozwój nowych synaps, ich liczba i wielkość, kształt drzewa dendrytycznego etc. w modelach *in vivo* lub *in vitro* AD.
3. Zbadanie zależności pomiędzy nieprawidłową homeostazą glukozy w mózgu a obwodowym poziomem glukozy w AD.
4. Poznanie mechanizmów łączących uszkodzenia komórek wywołane cukrzycą z procesami cięcia białka tau. Pozostaje do ustalenia, czy cukrzyca może również zwiększyć stopień innych potranslacyjnych modyfikacji tau, takich jak ubikwitynacja, nitracja, poliaminacja i sumoilacja.

Cele szczegółowy – Analiza i charakterystyka potencjalnych nowych biomarkerów rozwoju AD u pacjentów w współistniejącą cukrzycą typu 2.

[P2] Kubis-Kubiak A., Dyba A., Piwowar A. (2020) The interplay between diabetes and Alzheimer's disease – in the hunt for biomarkers. *Int. Mol. Sci.* 21;8:2744

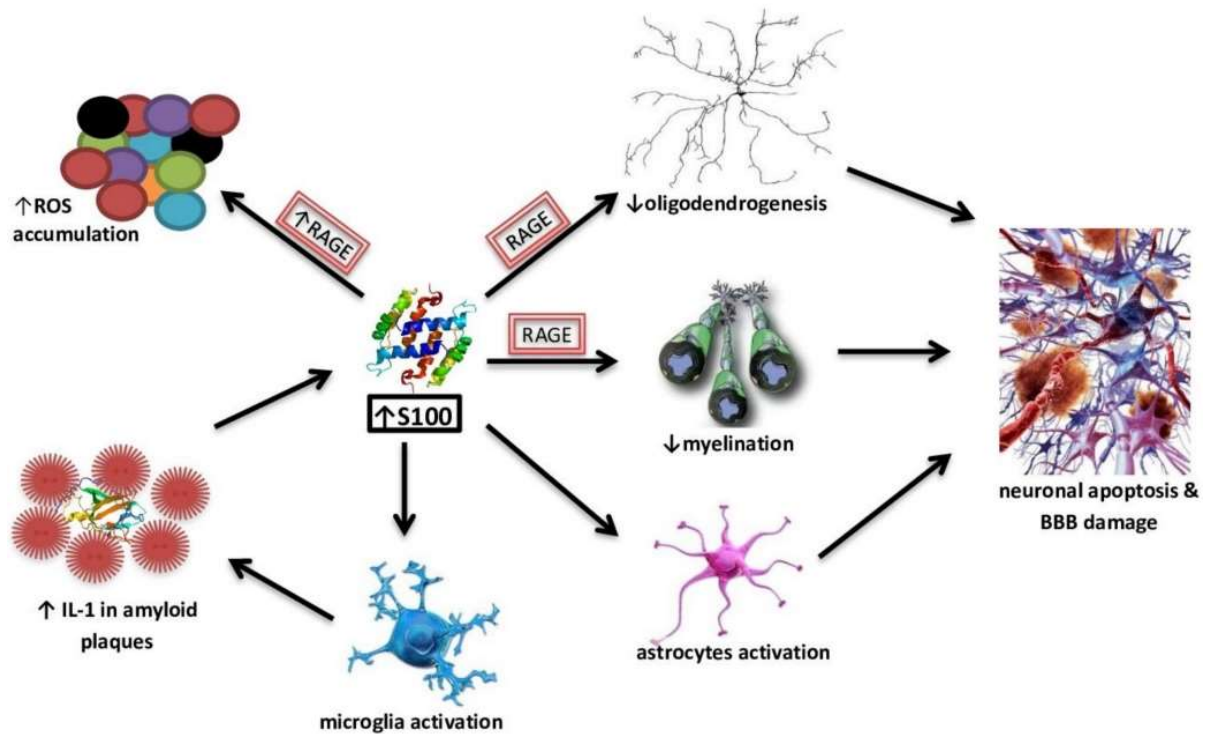
W kolejnej publikacji przeglądowej starałam się skupić na charakterystyce potencjalnych markerów współistnienia T2DM z AD ze szczególnym naciskiem na białka z rodziny S100. Liczne badania wskazują, że nie tylko hiperglikemia, ale także stężenie glukozy we krwi bliskie dolnej granicy normy na czczo (72 - 99 mg/dl) zwiększa częstość występowania AD, niezależnie od tego, czy T2DM rozwinie się w przyszłości czy nie. Ze względu na wcześniejszy rozwój AD u chorych na T2DM poszukuje się nowych biomarkerów zmian etiopatogenetycznych związanych z wczesnymi procesami neurodegeneracyjnymi będącymi konsekwencją zaburzeń węglowodanowych. AD można zdiagnozować z całkowitą pewnością dopiero *post-mortem*, gdy badanie mikroskopowe preparatów histopatologicznych mózgu ujawnia obecność charakterystycznych blaszek starczych i splątków neurofibrylarnych. Naukowcy badają szereg markerów chorobowych i testów diagnostycznych, takich jak geny, białka związane z chorobą i procedury obrazowania, które mogą dokładnie i wiarygodnie zdiagnozować charakterystyczne dla tej choroby procesy neuropatologiczne. Opisana w tej pracy rodzina białek S100 może w przyszłości przyczynić się do lepszej diagnostyki wczesnych zmian neurodegeneracyjnych, zwłaszcza u osób z T2DM.

Współwystępowanie AD z T2DM jest przedmiotem ciągłego zainteresowania naukowców, zwłaszcza w kontekście potencjalnych biomarkerów, biorąc pod uwagę, że choroby te mają wspólne mechanizmy w patofizjologii. Zmiany stężenia biomarkerów w płynach ustrojowych, zwłaszcza w płynie mózgowo-rdzeniowym (CSF), można zaobserwować znacznie wcześniej, przed wystąpieniem objawów choroby. Poziomy białka A β ₄₂, stężenie białka całkowitego tau i fosforylowanego tau wykazały wysoką dokładność diagnostyczną, ale nadal nie były wiarygodne w prodromalnej fazie rozwoju AD.[40,45] W tylnej korze przedklinkowej obręczy, tylnobocznej i przyśrodkowej korze skroniowo-ciemieniowej oraz w bocznej korze czołowej zidentyfikowano metodą PET z glukozą 18F; regiony hipometaboliczne, których występowanie może być stosowane jako biomarker we wczesnej diagnostyce AD.[41] Regiony te mają kluczowe znaczenie dla mowy i pamięci roboczej; dlatego ich dysfunkcja metaboliczna może być wykorzystana jako marker prognostyczny podatności na AD, a także wskaźnik progresji choroby. W badaniu przeprowadzonym na małpim modelu cukrzycy typu 2 (*Chlorocebus aethiops sabaues*), Kavanagh i wsp. [42] wykazali, że w CSF poziomy glukozy i mleczanu były silnie skorelowane ze stężeniami A β ₄₀ i A β ₄₂. Dodatkowo wykazano obniżony poziom aminokwasów i acylokarnityny w CSF. Te produkty uboczne mitochondrialnego katabolizmu

kwasów tłuszczowych, aminokwasów czy glukozy, odgrywają ważną rolę w zachowaniu homeostazy energetycznej mózgu. Dane te sugerują, że obwodowe zaburzenia metaboliczne mają konsekwencje objawiające się zaburzeniami właśnie w metabolizmie energetycznym mózgu. W badaniu przeprowadzonym przez Gupta i wsp. [43] wykazano, że wyższe wartości hemoglobiny glikowanej (HbA1C) są dobrym wskaźnikiem związku demencji i dysfunkcji poznawczych z niekontrolowaną T2DM. Stwierdzono również, że poziomy $A\beta_{42}$ i preseniliny 1 były znacznie wyższe u nastolatków z nadwagą i otyłością w porównaniu z osobami o normalnej masie ciała.[44]

Do rodziny białek S100 należy około 25 nisko-cząsteczkowych (10-12 kDa) białek należy do rodziny S100. Charakteryzują się one specyficznym dla komórek i tkanek występowaniem oraz podobną strukturą pierwotną. Mają dwie domeny: helisa-pętla-helisa oraz domenę strukturalną pętla-helisa, z którą wiążą się jony wapnia, cynku lub miedzi o różnym powinowactwie. Białka rodziny S100 są wielofunkcyjne, uczestnicząc m.in. w regulacji fosforylacji białek, wzrostu komórek, ruchliwości i różnicowania, cyklu komórkowym czy procesach transkrypcji. [46] Szczególnie zainteresowałam się białkiem S100B, ponieważ może ono być potencjalnym biomarkerem wczesnej fazy współistnienia T2DM z AD. Odgrywa ono rolę zarówno w zaburzeniach gospodarki węglowodanowej, jak i procesach neurodegeneracyjnych. Ciekawe zatem wydało mi się wyjaśnienie związku między stężeniem białka S100B a poziomem glukozy i insuliny zarówno obwodo jak i w mózgu. Wiele badań klinicznych sugeruje ważną rolę białka S100B w patogenezie chorób neurozwyrodnieniowych, gdyż jego podwyższone stężenie jest obserwowane w CSF lub mózgu pacjentów.[47-49]. Efekty zwiększonego stężenia białka S100B towarzyszą i przyczyniają się do procesów neurodegeneracji. Oprócz wpływu S100B na nadprodukcję reaktywnych form tlenu za pośrednictwem ich receptorów, białko to, w stężeniach ≥ 500 nM, zwiększa neurotoksyczność $A\beta_{25-35}$ w komórkach LAN-5. Co ciekawe, przy niższych stężeniach białko S100B wykazywało działanie ochronne przeciwko neurotoksyczności $A\beta_{25-35}$. [50] Ponadto ostatnie badania sugerują, że podwyższony poziom S100B ma szkodliwy wpływ na oligodendrogenezę i mielinizację poprzez procesy zależne od RAGE. W organotypowych kulturach plasterów tkanki mózgowej wysoki poziom białka S100B upośledzał integralność neuronalną i synaptyczną, jednocześnie indukując astroglejozę.[51] Podwyższone stężenia białka S100B w surowicy lub CSF są postrzegane jako marker uszkodzenia i aktywacji gleju.[52] Może więc, być to potencjalnie wykorzystane jako parametr do oceny progresji uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego. Jednak badania stężenia białka S100B w CSF i surowicy w grupie pacjentów z AD są częściowo sprzeczne.[53] Stwierdzono, że pacjenci z AD wykazują niższe stężenia białka S100B w surowicy niż zdrowe

osoby w podeszłym wieku [54]. Niektóre badania wskazują na korelację między poziomami białka S100B w CSF a stanem poznawczym lub atrofią mózgu chorych na AD, podczas gdy inne nie wykazały takich zależności.[49, 55, 56] Badania kohortowe ujawniły, że podwyższona produkcja białka S100B jest pozytywnie skorelowana ze zdolnościami poznawczymi, szczególnie w przypadku szybkości percepcji oraz zdolności werbalnych u zdrowych osób starszych [57]. Poniżej na rysunku nr. 2 prezentuje potencjalne mechanizmy biorące udział w procesach neuropatogenezy a wysokimi stężeniami białka S100B.



Rys. 2 Potencjalny mechanizm współzależności między białkiem S100B a procesami zaangażowanymi w neuropatogenezę. ROS- reaktywne formy tlenu; RAGE- receptory zaawansowanych produktów końcowych glikacji; IL-1 – interleukina 1; BBB- bariera krew-mózg.

Dane literaturowe wskazują na związek między stężeniem glukozy a sekrecją białka S100B. Kheirouri i wsp. [58] wykazali zwiększone stężenie białka S100B w surowicy pacjentów z zespołem metabolicznym charakteryzującym się upośledzoną glukozą na czczo, otyłością obwodową, dyslipidemią i nadciśnieniem czy podwyższonym poziomem insuliny. W hodowlach astrocytów szczurzych w warunkach stresu metabolicznego, tj. poddanych warunkom niedoboru glukozy, tlenu i surowicy, nastąpiło zwiększone wydzielanie białka S100B. Jednak po 12 i 24 godzinach hodowli ekspresja mRNA dla białka S100B znacznie się zmniejszyła, a po 2 dniach inkubacji zanotowano znaczny spadek wydzielania białka S100B. Na podstawie tych obserwacji postawiono hipotezę, że białko S100B może być aktywnie wydzielane przez mikroglej we wczesnych stadiach stresu metabolicznego [59].

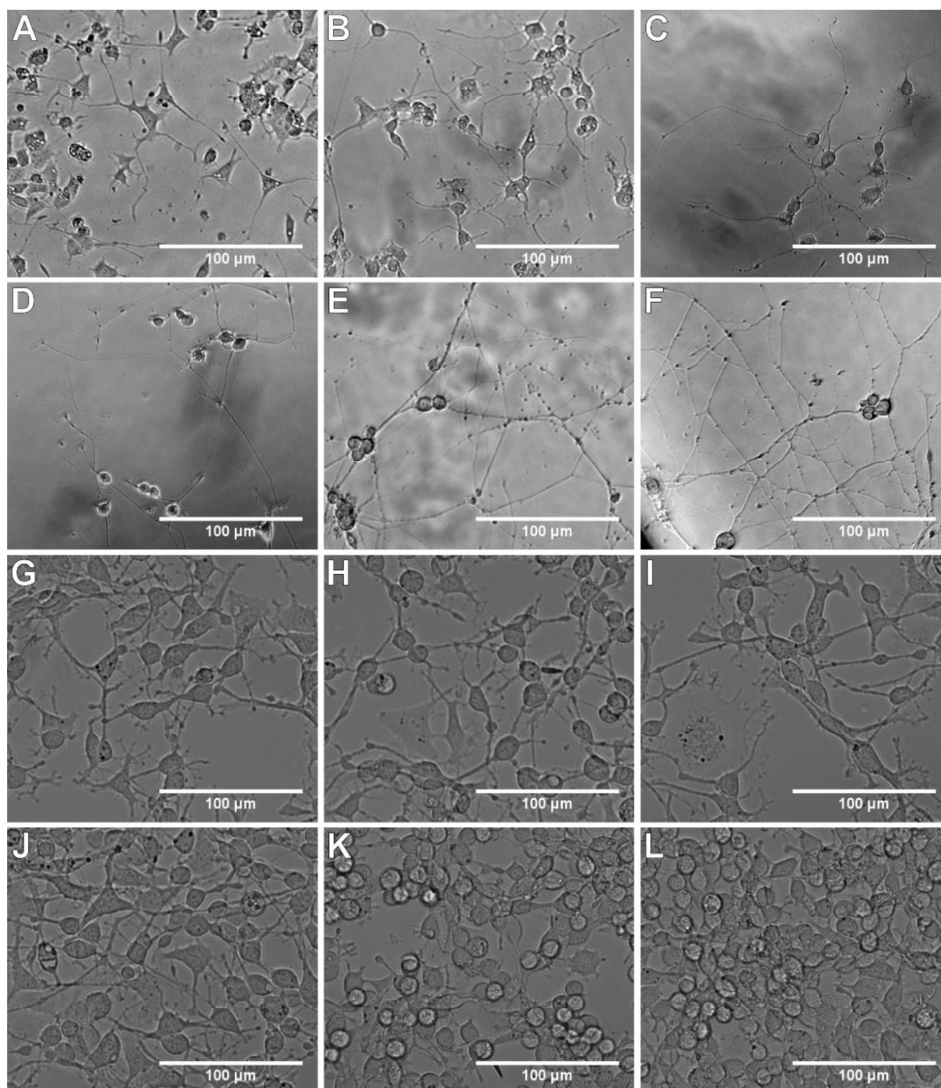
Cel szczegółowy - Optymalizacja i charateryzacja komórkowego modelu badawczego stosowanego w badaniach łączących zaburzenia metaboliczne zachodzące w komórkach tkanki nerwowej z patogenezą zmian neurozwyrodnieniowych u osób w podeszłym wieku.

[P3] Wiatrak, B., Kubis-Kubiak, A., Piwowar, A., Barg, E. (2020). PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions. *Cells*, 9(4), 958

Po nakreśleniu w dwóch pracach przeglądowych tematyki i kierunku badań moja uwaga skupiła się na charakterystyce oraz optymalizacji modelu komórkowego, który chciałam zastosować w badaniach nad współistnieniem AD z T2DM. Dostępnych jest stosunkowo niewiele publikacji charakteryzujących te dwa podtypy linii PC12. Celem artykułu wchodzącego w skład pracy habilitacyjnej było scharakteryzowanie wykorzystania dwóch różnych wariantów linii komórkowych PC12, a także opisanie ich różnicowania i przyrostu wypustek neuronalnych po zastosowaniu ludzkiego lub szczurzego NGF na różnych podłożach. Oceniliśmy morfologię komórek, długość neurytów, gęstość i wzrost (mierzone spektrofluorymetrycznie) oraz ekspresję biomarkerów neuronalnych (Doublecortin i NeuN). Optymalne zaprojektowanie eksperymentu, do którego należy prawidłowy dobór modelu komórkowego ma ogromny wpływ na rezultaty uzyskanych eksperymentów stanowiących podstawę hipotezy badawczej. Zastosowanie niewłaściwego modelu może prowadzić do błędnej oceny właściwości neurotoksycznych. Ponadto środowisko, w którym hodowana jest linia komórkowa, może wpływać na ich metabolizm, a tym samym zmieniać końcowe wyniki przeprowadzanych doświadczeń. Linia komórkowa PC12 jest jedną z najczęściej stosowanych w badaniach neurobiologicznych, w tym w badaniach nad neurotoksycznością, neuroprotekcją, neurosekrecją, zapaleniem nerwów i synaptogenezą. Linia PC12 obejmuje dwie kolekcje: chińską (słabo, średnio i wysoko zróżnicowaną) oraz ATCC (American Type Culture Collection) obejmującą komórki PC12 hodowane w zawieszynie oraz adherentne komórki PC12. Komórki te hodowane w zawieszynie mają tendencję do agregowania i słabo przylegają do niepowlekaných powierzchni. Linia komórkowa PC12 pochodząca z guza chromochłonnego szczura jest unieśmiertelnioną linią komórkową podobną do pierwotnej hodowli neuronów płodowych. Są to komórki stosunkowo łatwe do pasażowania i hodowli oraz posiadają pewne cechy neuronów, co czyni je przydatnymi w badaniach fizjologii nerwów i farmakologii. Komórki PC12 to rodzaj komórek katecholaminowych, które syntetyzują, przechowują i uwalniają norepinefrynę i dopaminę. Istnieją znaczące różnice morfologiczne i wzrostowe między liniami komórkowymi PC12 zawieszynowymi i PC12 adherentnymi. W środowisku naukowym uważa się, że linia PC12 adherentna nadaje się tylko do prowadzenia eksperymentów z inhibitorami kinaz białkowych związanych

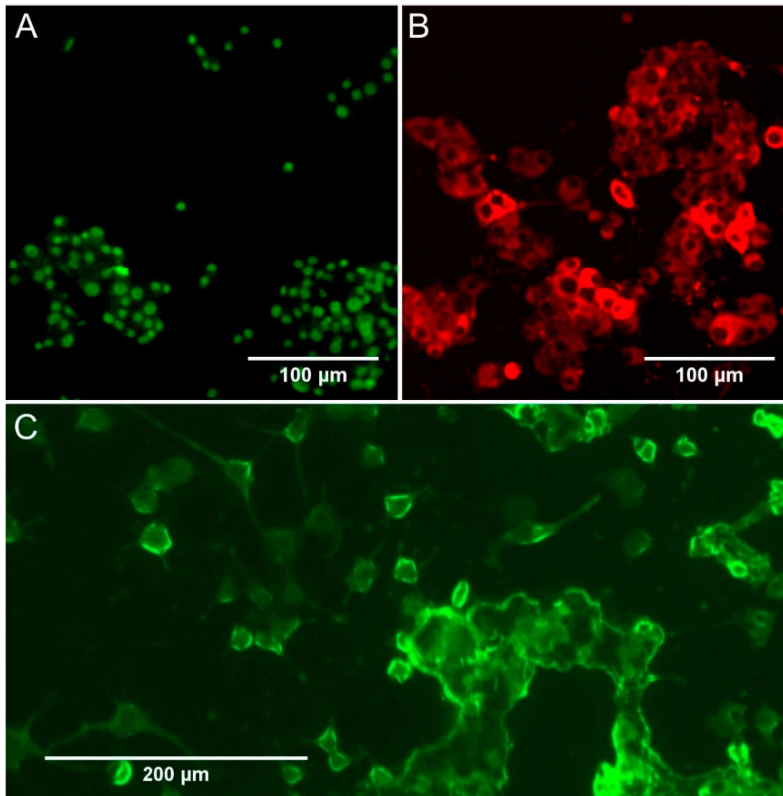
z Rho. Natomiast komórki zawieszinowe zróżnicowane NGF, przypominają neurony kory mózgowej – stosowanie tej linii komórkowej jest zalecane w badaniach fizjologii i patologii układu nerwowego.[60]

W zaprojektowanych badaniach po 24 godzinach adhezji i regeneracji komórek rozpoczęłam proces różnicowania przy użyciu medium zawierającego NGF - polipeptydowy czynnik neurotroficzny, który aktywuje kinazę receptora tropomiozyny A i ułatwia przejście komórek od proliferacji do różnicowania. NGF wpływa na zmiany biochemiczne, elektrofizjologiczne i morfologiczne w komórkach PC12 upodabniając je do nerwów współczulnych. Pod jego wpływem zachodzi wiele zmian biochemicznych: zwiększa się liczba receptorów dopaminy (co upodabnia komórki PC12 do neuronów dopaminergicznych śródmózgowia), zwiększa się wrażliwość na acetylocholinę, a na błonach komórkowych pojawiają się kanały potasowe, które wykazują pobudliwość elektryczną.[61-62] Podczas inkubacji komórek PC12 z NGF ekspresja ważnego w neurytogenezie, białka 2 związanego z mikrotubulami (MAP-2) wzrasta kilkukrotnie.[63-64] Wszystko to potwierdza, że tylko zróżnicowane komórki PC12 mogą stanowić model komórek nerwowych. Czas inkubacji w medium do różnicowania zawierającym NGF jest dobierany indywidualnie przez badaczy. Zwykle jest to od 2 do 14 dni. W obu testowanych liniach PC12 (adherentnych i nieadherentnych) zaobserwowaliśmy wzrost długości i gęstości neurytów między 2 a 3 dniem inkubacji z NGF. W komórkach zawieszinowych stan neurytów między 3 a 5 dniem pozostawał stabilny, a po 5 dniu inkubacji nastąpił kolejny wyraźny wzrost długości i gęstości. W przypadku linii PC12 adherentnej zauważyliśmy, że od 7 dnia inkubacji z NGF neuryty stawały się coraz krótsze, a ich gęstość spadała od 5 dnia (Rys. 3). Ponadto zaobserwowaliśmy zwiększoną proliferację komórek w 14. i 21. dniu. Drubin et al. potwierdzili, że w ciągu pierwszych 2 dni inkubacji z NGF nie nastąpił wyraźny przyrost masy mikrotubul, a po 3 dniach długość neurytów wzrosła nawet dwukrotnie [65]. Das et al. zauważyli w swoich badaniach, że w 6 dniu inkubacji komórek PC12 w obecności 50ng/ml NGF efekt osiągnął plateau [66]. Niestety, żaden z wymienionych autorów nie podał w artykule, która linia PC12 została dokładnie użyta oraz nie opisał numeru pasażowania komórek.



Rys. 3 Mikrofotografie hodowli komórkowych w kolejnych dniach oceny neurytów: (A–F) linia komórkowa PC12 zawieszinowa; (G – L) linia komórkowa PC12 adherentna (A, G) 2 dni inkubacji z czynnikiem wzrostu nerwów; (B,H) 3 dni; (C,I) 5 dni; (D,J) 7 dni; (E, K) 14 dni; (K,L) 21 dni.

Ekspresję białka NeuN obserwuje się w większości dorosłych komórek nerwowych, podczas gdy ekspresja doublekortyny jest charakterystyczna dla niedojrzałych, rozwijających się komórek tego typu. Poziom ekspresji doublekortyny dla komórek PC12 znacznie wzrasta pod wpływem NGF [67]. Wiadomo również, że białko to jest inhibitorem wzrostu neurytów [68]. W moich badaniach zaobserwowałam ekspresję doublekortyny i NeuN dla zawieszinowych komórek PC12, podczas gdy dla komórek adherentnych odnotowałam ekspresję tylko białka NeuN. Odnotowaliśmy ekspresję NeuN w obu liniach komórkowych, ale w zawieszinowych komórkach PC12 ekspresja była zlokalizowana w jądrach komórkowych, a w komórkach adherentnych występowała dla całej komórki, zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie (Rys. 4). Przez wiele lat NeuN był uważany za swoisty marker, który pozwala na rozpoznanie dorosłych neuronów.[68] Ostatnie badania wykazały jednak, że ocena ilościowa tego białka nie daje wiarygodnych informacji, ponieważ jego ekspresja występuje w wielu tkankach, jak również w wielu liniach komórkowych, które nie są komórkami neuronalnymi.[62,69]



Rys.4 Mikrofotografie przedstawiające ekspresję biomarkerów neuronalnych:

(A) ekspresja NeuN w komórkach PC12 zawiesinowych;

(B) ekspresja Doublecortin w komórkach PC12 zawiesinowych;

(C) ekspresja NeuN w komórkach PC12 adherentnych.

Konieczna jest dodatkowa ocena, czy NeuN ulega ekspresji w jądrze lub wokół jądra lub w cytoplazmie. Inni badacze również obserwują komórki ekspresjonujące białko NeuN zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie, tak jak zaobserwowaliśmy to w naszym badaniu w przypadku komórek PC12 adherentnych. Przyjęto, że białko NeuN, będące produktem genu *Rbfox3*, jest regulatorem transkrypcji zaangażowanym w różnicowanie neuronów.[62] Jednak prawdopodobnie pełni również inne, wciąż nieznanne funkcje, na co wskazuje jego obecność w cytoplazmie komórek wielu tkanek. W mojej pracy oryginalnej należącej do cyklu habilitacyjnego wykazałam, że stężenie podawanego NGF ma duże znaczenie dla stopnia zróżnicowania zarówno komórek PC12 zawiesinowych, jak i PC12 adherentnych. Neuryty były średnio około dwa razy dłuższe po podaniu 100 ng/mL NGF w porównaniu do 50 ng/mL. Stężenie nie wpłynęło jednak na średnią liczbę neurytów w komórkach (gęstość neurytów). Poza tym dla obu linii komórkowych działanie szczerzego NGF w stężeniu 100 ng/ml było nieco silniejsze niż działanie ludzkiego NGF. Dodatkowo, nie było różnicy w długości lub gęstości neurytów w zależności od koncentracji komórek PC12 adherentnych.

Według naszej wiedzy jest to pierwszy artykuł, który opisuje różnice w metodologicznym podejściu do zawiesinowych i adherentnych wariantów linii komórkowej PC12, co ma swoje odzwierciedlenie w ilości cytowań.

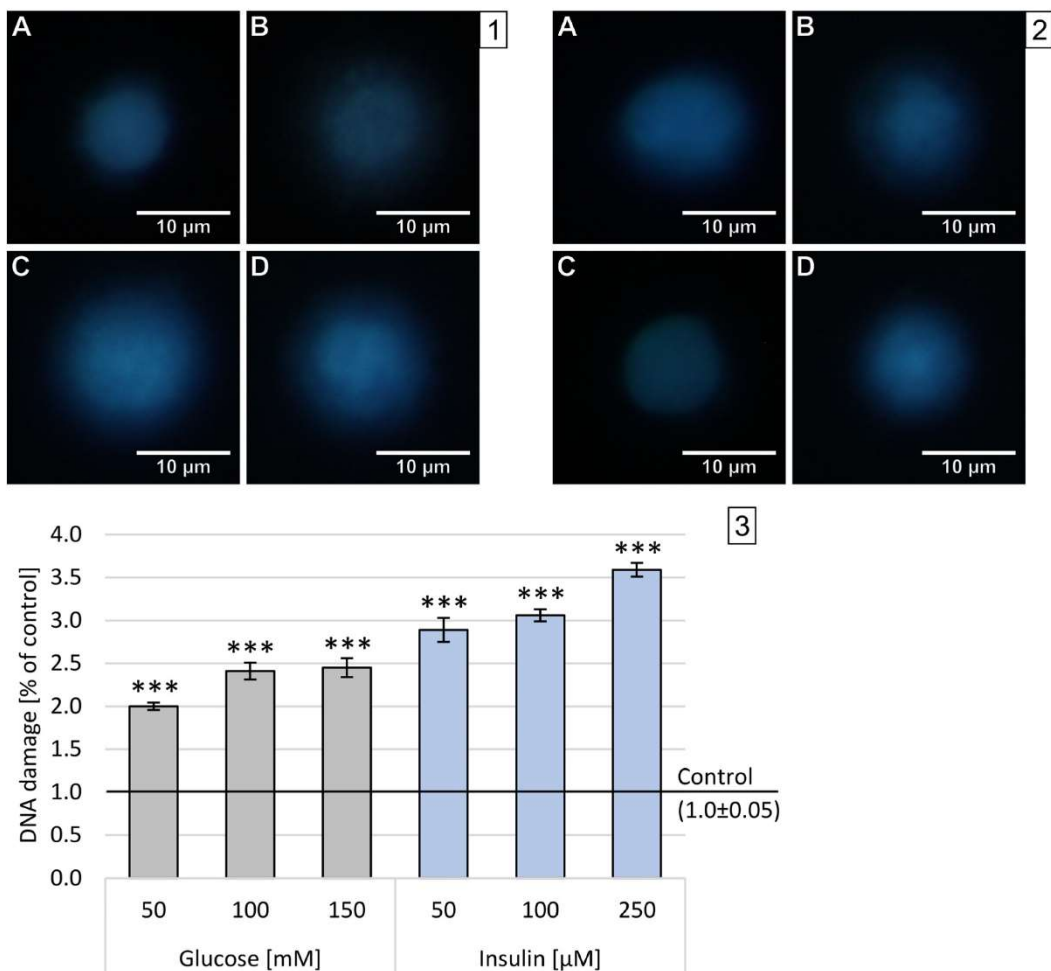
Cel szczegółowy - Analiza roli białka S100B w korelacji ze stresem oksydacyjnym i nitrozowym w zaburzonej homeostazie glukozy/insuliny w zróżnicowanych komórkach linii PC12.

[P4] Kubis-Kubiak A, Wiatrak B, Piwowar A. (2021) The Impact of high glucose or insulin ex-posure on S100B protein levels, oxidative and nitrosative stress and DNA damage in neuron-like cells. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(11):5526

W dalszych badaniach skoncentrowałam się na analizie roli wybranych białek z rodziny S100 w interakcji pomiędzy zmianami neurozwyrodnieniowymi a zaburzeniami metabolizmu insuliny i glukozy. Wewnątrzkomórkowo białko S100B działa ochronnie na neurony przed toksycznym działaniem glutamianu oraz stymuluje wzrost neurytów i przeżycie neuronów. W wysokich stężeniach białka rodziny S100 mogą indukować apoptozę. Celem tej pracy oryginalnej wchodzącej w skład cyklu habilitacyjnego było poszerzenie aktualnej wiedzy na temat możliwego bezpośredniego wpływu hiperglikemii i -insulinemii na poziom białka S100B oraz porównanie go z markerami stresu oksydacyjnego, takimi jak reaktywne formy tlenu, tlenku azotu czy na poziom uszkodzenia dwuniciowego DNA. Według mojej wiedzy nie ma dostępnych informacji dotyczących roli białka S100B w patologicznym mechanizmie leżącym u podstaw współzależności T2DM z AD. W publikacji tej, wchodzącej w skład cyklu habilitacyjnego postawiłam hipotezę, iż stężenie białka S100B jest podwyższone w neuronach z równoczesnymi zaburzeniami metabolicznymi i zmianami neuropatologicznymi. Fakt ten prawdopodobnie można wykorzystać do wykrycia pierwszych zmian patologicznych wewnątrzkomórkowych związanych z demencją i jednoczesną cukrzycą typu 2.

W opublikowanych badaniach wykazaliśmy, że środowiska o wysokim stężeniu glukozy lub insuliny mają negatywny wpływ na metabolizm neuronalny poprzez podniesienie poziomu markerów stresu oksydacyjnego. Statystycznie istotny wzrost poziomu reaktywnych form tlenu zaobserwowano po godzinnej inkubacji z glukozą lub insuliną we wszystkich analizowanych stężeniach, przy czym najwyższe stężenie uzyskano dla 150mM glukozy. Po podaniu 100µM insuliny uzyskano najwyższy poziom reaktywnych form tlenu. W przypadku badań nad wpływem hiperglikemii lub insulinemii na poziom tlenków azotu zaobserwowano statystycznie istotny wzrost poziomu tlenku azotu zarówno w obecności glukozy, jak i insuliny po godzinnej inkubacji. Wyniki uzyskane po godzinnej inkubacji z glukozą były wyraźnie zależne od stężenia, przy statystycznie istotnym wzroście po zastosowaniu 100mM i 150mM glukozy. W przypadku insuliny wszystkie trzy stężenia powodowały statystycznie istotny wzrost poziomu tlenku azotu po godzinnej inkubacji w porównaniu z komórkami nie traktowanymi niczym. Uzyskane w publikacji wyniki potwierdzają pogląd, że hiperglikemia i/lub insulinemia

powoduje wzrost poziomów reaktywnych form tlenu i tlenków azotu w neuronach. Ponadto stwierdzono istotną dodatnią korelację między tymi parametrami po godzinnej inkubacji z glukozą. Analiza statystyczna potwierdziła istotne różnice pomiędzy poziomami reaktywnych form tlenu vs pęknięcia dwuniciowego DNA po 1 i 24 godzinach inkubacji z insuliną. Sugeruje się, że z biegiem lat te niewielkie zmiany metaboliczne w tkance neuronalnej mogą prowadzić do dezaktywacji lub przesunięcia kluczowych szlaków cyklu komórkowego, takich jak szlak MEK-ERK1/2-NF- κ B, a także do aktywacji czynników proapoptotycznych, co może prowadzić do akumulacji A β . Chociaż należy zachować ostrożność w ekstrapolacji wyników *in vitro* na sytuację *in vivo*, nasze dane są zgodne z sugestią, że szybko zmieniające się stężenia glukozy i/lub insuliny w tkance neuronalnej mogą być jedną z pierwszych zmian patologicznych związanych z AD. Wysoki poziom tlenków i wolnych rodników azotowych może prowadzić do pęknięcia dwuniciowego DNA (DBS). Stopień pęknięć dwuniciowego DNA oceniano mierząc wielkość dyspersji chromatyny po godzinnej oraz 24 godzinnej inkubacji z podwyższonymi stężeniami glukozy czy insuliny (Rys.5)



Rys. 5. Analiza pęknięć dwuniciowego DNA w zróżnicowanych komórkach PC12 po godzinnej inkubacji z glukozą lub insuliną. (1) Przykładowe mikrofotografie dyspersji chromatyny jądrowej: A – kontrolna (komórki kontrolne), B – glukoza 50 mM, C – glukoza 100 mM i D – glukoza 150 mM. (2) Przykładowe mikrofotografie halo dyfuzji jądrowej: A – kontrolna (komórki kontrolne), B – insulina 50 μ M, C – insulina 100 μ M i D – insulina 150 μ M. (3) Porównanie względnego NDF dla komórek neuronalnych inkubowanych przez 1 h z glukozą lub insuliną.

Zakres rozszczepienia nici określono ilościowo poprzez obliczenie współczynnika dyfuzji jądrowej (NDF), który reprezentuje stosunek między całkowitą powierzchnią halo plus jądra a powierzchnią jądra. Dane są wyrażane jako względny NDF, obliczany przez odjęcie NDF komórek kontrolnych od NDF komórek poddanych działaniu substancji. W komórkach traktowanych glukozą przez godzinę wzrost DBS był na ogół mniejszy niż po inkubacji z insuliną we wszystkich stosowanych stężeniach. Wykazano zależność stopnia DSB od stężenia dla wszystkich badanych stężeń i substancji - im wyższe stężenie, tym silniejsze halo dyspersyjne chromatyny. Najwyższe DBS zaobserwowano po inkubacji z 250 μ M insuliną, podczas gdy najniższe poziomy DBS zmierzono po zastosowaniu 50mM glukozy. Obserwowany efekt był statystycznie istotny ($p < 0,001$) we wszystkich warunkach eksperymentalnych. Podobnie jak w przypadku oznaczania poziomu ROS, inkubacja komórek z glukozą lub insuliną przez 24 godziny skutkowała mniejszym uszkodzeniem nici DNA niż inkubacja przez godzinę. Istniała silna zależność od stężenia zarówno glukozy, jak i insuliny. Glukoza spowodowała słabe uszkodzenie DNA z maksymalnym poziomem po 24 godzinach inkubacji z glukozą 150mM. Inkubacja z insuliną dała odwrotny efekt, prowadząc do regeneracji podwójnych nici DNA, przy minimalnych wartościach po 24 godzinach inkubacji z 50 μ M.

Kolejnym celem naszej pracy była analiza zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych stężeń białka S100B w celu oceny potencjalnej jego roli w zaburzeniach metabolicznych zachodzących w komórkach neuronalnych. Pojedynczą wyraźną obserwacją, która wyłoniła się z porównania danych, było to, że ani stany podwyższonego stężenia glukozy czy insuliny nie wywoływały wypływu białka S100B z neuronów, a co więcej, nawet zmniejszały jego zewnątrzkomórkowy poziom. Co ciekawe, w lizatach komórkowych zaobserwowano niewielki, ale nadal istotny statystycznie, wzrost stężenia białka S100B. Stwierdzono istotnie pozytywną korelację statystyczną pomiędzy poziomem białka S100B w supernatantach komórkowych a poziomem reaktywnych form tlenu. Stany hiperinsulinemiczne wywoływały silną pozytywną korelację między stężeniem S100B a poziomem NO lub rozpadem dwuniciowego DNA. Podsumowując dane te potwierdzają pogląd, że komórkowe białko S100B może zachowywać się jako czynnik neuroprotektoryjny przeciwko zewnątrzkomórkowym wahaniom glukozy/insuliny. Nasze obserwacje są zgodne z wynikami przeprowadzonymi przez Nardina i

wsp. [70] na pierwotnych szczurzych astrocytach kory mózgowej, gdzie po 24 godzinach zewnątrzkomórkowe stężenie białka S100B zmniejszyło się o około 45% w środowisku o wysokiej zawartości glukozy. Zaobserwowano również spadek zawartości glutationu, ale nie aktywności wychwyty glutaminianu. Ważne jest, aby podkreślić fakt, że członkowie rodziny białek S100 wywierają podwójny efekt (neurotroficzny lub neuroprotektoryjny) na neurony i astrocyty. Nasze odkrycia są zgodne z wcześniejszymi wynikami przedstawionymi przez Alhemeyera i wsp. [71], którzy wykazali, iż neurotoksyczności spowodowanej przez glutaminian i staurosporynę może przeciwdziałać białko S100B. Białko S100B może również hamować różnicowanie komórek indukowane NGF, ale zwiększona ekspresja S100B nie odwróciła efektów różnicowania w już zróżnicowanych komórkach PC12. Może to sugerować wpływ białka S100B na hamowanie procesu różnicowania komórek we wczesnych stadiach. [72] Christl i wsp. [73] oszacowali, że stężenia białka S100B w CSF mogą mieć wartość diagnostyczną szczególnie we wczesnej fazie AD, ponieważ spadają one do fizjologicznego poziomu w bardziej zaawansowanych stadiach. Badania na zwierzętach dostarczają dodatkowych danych wskazujących na znaczenie S100B w procesach neurodegeneracyjnych. Wyniki uzyskane w analizie uczenia się przestrzennego u myszy Tg2576 z nadekspresją S100B były niższe w porównaniu do zwierząt z knockout'em tego białka. Zwierzęta te charakteryzowały się: większą ilością złogów amyloidowych w mózgu, wysokim stopniem zaawansowania amyloidowej angiopatii kongo-filnej, zwiększonym metabolizmem amyloidogennych APP, astrocytozą, mikroglejozą oraz podwyższonym poziomem cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-1 β i IL-6) już w wieku 7-9 miesięcy. Myszy, których gen kodujący S100B został inaktywowany, wykazywały zwiększoną pamięć przestrzenną i zapamiętywanie pod wpływem lęku oraz zwiększone długoterminowe wzmocnienie synaptyczne w sektorze CA1 hipokampa. Wyniki te wskazują, iż pomimo odgrywania ważnej roli w reakcjach zapalnych w mózgu, S100B może odgrywać również rolę w bezpośrednim promowaniu amyloidogenego przetwarzania APP.[74].

Cel szczegółowy – białka S100B oraz S100A8 jako mediatory zaburzeń metabolicznych występujących w neuronach dopaminergicznych.

[P5] Kubis-Kubiak A., Wiatrak B., Piwowar A. (2022) Hyperglycaemia or insulinemia modulates S100B, S100A8, amyloid β 1-40 and 1-42 secretion and induce morphological changes in dopaminergic neurons. Biomed. Pharmacother. 156:113869

Alarmujące dane dotyczące znacznie zwiększonej globalnej zachorowalności na cukrzycę i związane z nią powikłania napędzają dokładny proces badawczy w celu odkrycia nowych i skutecznych opcji terapeutycznych. Szczególną uwagę zwrócono na rodzinę białek S100, których ekspresja znacznie wzrasta w chorobach neurodegeneracyjnych, autoimmunizacyjnych, zaburzeniach zapalnych i nowotworach.[75] Białka z rodziny S100 są aktywnie wydzielane podczas stresu metabolicznego i oksydacyjnego, ale ich rola w komórkach nerwowych nie została jeszcze wyjaśniona. Wykazano jednak, że działają one w sposób zależny od dawki, co może mieć kluczowe znaczenie w modulacji metabolizmu glukozy i insuliny w mózgu. Ta rodzina białek charakteryzuje się dużą różnorodnością i swoistością wobec komórek i tkanek. Ich funkcje i mechanizmy działania nie zostały jeszcze w pełni poznane, jednak ich udział w wielu procesach wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych sugeruje ważną rolę w utrzymaniu prawidłowego funkcjonowania organizmu. Jako proteiny związane z uszkodzeniem, białka S100 są również uwalniane do środowiska zewnątrzkomórkowego w odpowiedzi na uszkodzenie, stres lub stan zapalny, gdzie stymulują komórki układu odpornościowego i intensyfikują kaskady prozapalne.[76-77] W procesie prawidłowego funkcjonowania komórek układu nerwowego bierze udział białko S100B, które w zależności od stężenia w przestrzeniach zewnątrzkomórkowych może mieć działanie troficzne lub toksyczne. W małych, nanomolowych stężeniach, występujących w warunkach fizjologicznych, działa neuroprotekcynie na neurony, stymuluje wzrost neurytów i sprzyja proliferacji astrocytów. Chroni również przed stresem komórkowym i osłabia aktywację mikrogleju poprzez przetwornik sygnału i aktywator szlaku transkrypcji 3.[78] Z drugiej strony, w stężeniach mikromolowych białko S100B inicjuje apoptozę neuronów i nasila stan zapalny i neurodegenerację. Osiąga to poprzez zwiększenie ekspresji i uwalniania cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6 i TNF- α , w sposób zależny od NF- κ B i białka aktywatora 1.[79] Ponadto, w odpowiedzi na interferon-gamma, zwiększa produkcję NO poprzez stymulowanie ekspresji mRNA syntazy informacyjnej NO. Prowadzi to do aktywacji mikrogleju i nadmiernej stymulacji RAGE, przy czym wysokie stężenia prowadzą do nadprodukcji i akumulacji ROS w neuronach.[80]

Białko S100A8 odgrywa istotną rolę w rozwoju stanu zapalnego. Silnie reguluje wrodzoną odpowiedź immunologiczną poprzez reorganizację cytoszkieletu i rekrutację leukocytów, neutrofilów i monocytów. Białko S100A8 ulega ekspresji głównie w makrofagach, komórkach dendrytycznych, komórkach śródbłonna mikronaczyniowego, komórkach nabłonkowych i fibroblastach po aktywacji. Intensyfikuje różnicowanie komórek, produkcję TNF- α i IL-1 β w komórkach szpikowych. Oczyszcza przez CD36 wewnątrzkomórkowy ROS i stabilizuje NO

w neutrofilach, chroniąc przed uszkodzeniem oksydacyjnym w zmianach zapalnych. Wewnątrzkomórkowo wywiera działanie przeciwzapalne. W analizie proteomicznej osoby z AD wykazywały najwyższe poziomy S100A8 i S100A9 w ślinie w porównaniu ze zdrowymi kontrolami poniżej 70 roku życia.[81] Podwyższone stężenia białka S100A8 zostały powiązane z powikłaną retinopatią cukrzycową u pacjentów z cukrzycą typu 2.[82] Zaobserwowano również zwiększoną ekspresję mRNA dla tego białka w mikrogleju pobranym od pacjentów z AD po stymulacji $A\beta_{42}$. Przewlekłe wydzielanie S100A8 doprowadziło do aktywacji mikrogleju, która sprzyjała zapaleniu poprzez stymulowanie wydzielania neurotoksycznych cytokin prozapalnych, takich jak IL-1, IL-6, IL-8 i białka chemotaktyczne monocytów-1, co jest ważne w patologii AD.[83] Wykazano, że traktowanie komórek nerwowych rekombinowanym białkiem S100A8 doprowadziło do zwiększenia syntezy $A\beta_{42}$, przy jednoczesnym zmniejszeniu produkcji $A\beta_{40}$. [84] Ponadto autorzy zaobserwowali zewnątrzkomórkowe ziarniste agregaty białka S100A8 w hipokampach starzejących się myszy Tg2576 i TgAPP^{Arctic}. Wyniki te potwierdzają hipotezę o istnieniu dodatniego sprzężenia zwrotnego między produkcjami S100A8 i $A\beta$. O ile nam wiadomo, istnieje tylko jedna praca określająca rolę białek z rodziny S100, a mianowicie S100A8, w zapaleniu wysp trzustkowych indukowanym aktywacją receptorów toll-podobnych w cukrzycy typu 2.[77]

"Głód" mózgu i utrata neuronów jest wywoływana przez utratę zdolności do radzenia sobie z glukozą i zmniejszoną aktywność kaskady sygnalizacyjnej insuliny, dlatego należy wyjaśnić rolę białek z rodziny S100 w tych procesach. Chociaż wiele badań ujawniło możliwe mechanizmy stojące za rolą cukrzycy w zmianach neuropatologicznych, wpływ zaburzonego metabolizmu glukozy i insuliny na stężenia S100B i S100A8 nie został jeszcze zbadany w kontekście AD.[85,86] Powstaje pytanie – jaka jest rola białek z rodziny S100 w zaburzeniach metabolicznych obserwowanych podczas degeneracji neuronów? Celem niniejszej pracy było wyjaśnienie związku między wysokimi stężeniami glukozy i insuliny a zewnątrz- i wewnątrzkomórkowymi poziomami białek S100B i S100A8, a także korelacji z toksycznymi ($A\beta_{42}$) i fizjologicznymi ($A\beta_{40}$) formami amyloidu β . W publikacji analizowaliśmy wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe poziomy $A\beta_{40}$, jego toksycznej formy $A\beta_{42}$, białka S100B i S100A8 po ekspozycji modelu neuronów dopaminergicznych na różne stężenia glukozy lub insuliny. Miało to na celu stworzeniu modelu odzwierciedlającego "mikro-zaburzenia" występujące w homeostazie metabolicznej komórek budujących tkankę nerwową, która jest bardzo wrażliwa na zmiany energetyczne. Po ustaleniu optymalnych stężeń glukozy i insuliny za pomocą testów cytotoxyczności i proliferacji przeanalizowano wpływ glukozy i insuliny na akumulację ROS. W stanach hiperglikemicznych, a także przy fizjologicznym stężeniu insuliny,

produkcja ROS była niewykrywalna po 24 h. Wyniki te są zgodne z danymi uzyskanymi w naszej wcześniejszej publikacji, w których aktywacja ROS była widoczna po godzinie inkubacji. Następnie zanalizowano wpływ hipermetabolizmu na zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe stężenia $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$. Wewnątrzkomórkowe poziomy $A\beta_{40}$ były znacznie obniżone we wszystkich testowanych warunkach w porównaniu z komórkami nietraktowanymi lub fizjologicznymi stężeniami insuliny (1nM). Podobne dane uzyskano dla zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych stężeń $A\beta_{42}$ po inkubacji z 100mM glukozą, 50nM oraz 100 nM insuliną. Badanie korelacji między badanymi formami amyloidu wykazały, że warunki hiperglikemiczne wydawały się sprzyjać pozytywnemu związkowi między $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$, podczas gdy środowisko hiperinsulinemiczne wydawało się wywoływać odwrotny efekt. Ocena stężenia białka S100B w stanach hiperglikemicznych i hiperinsulinemicznych wykazała statystycznie istotny wyrzut białka do przedziału zewnątrzkomórkowego. Największy wpływ S100B obserwowano po podaniu 100mM glukozy i 1nM insuliny, przy wartościach o 60% i 63% wyższych w porównaniu do komórek kontrolnych. Inkubacja z 50 mM glukozą lub 50 nM insuliną doprowadziła do 30% zmniejszenia zewnątrzkomórkowego S100B, podczas gdy stany hiperinsulinemiczne (insulina 100 nM) hamowały ten proces o 16,5%. Stwierdzono silny zależny od stężenia wpływ zarówno podawania glukozy, jak i insuliny na poziomy białka S100B w supernatantach komórkowych. Im wyższe stężenie glukozy, tym wyższe stężenie białka S100B w supernatantach komórkowych. Tymczasem wyższe stężenia insuliny doprowadziły do obniżenia poziomu S100B w supernatantach komórkowych. W przeciwieństwie do danych uzyskanych z supernatantów, poziomy cytoplazmatyczne białka S100B znacznie zmniejszyły się we wszystkich warunkach eksperymentalnych. Największy spadek o 55% stwierdzono po inkubacji z 50nM insuliną. Obniżenie poziomu o około 20% wykryto w lizatach komórkowych po inkubacji z 50mM glukozą i 1nM insuliną, co było podobne do efektu, jaki oba miały na poziomy $A\beta_{42}$. Dane te potwierdzają podwyższone poziomy białka S100B zarejestrowane w surowicy pacjentów z AD. Takie wzrosty mogą korelować z uszkodzeniem neuronów i aktywacją mikrogleju i mogą odzwierciedlać ciężkość choroby. Ponadto zaobserwowano zwiększoną ekspresję S100B we wczesnych stadiach choroby, co może wskazywać na jej udział w inicjacji i/lub tworzeniu płytek β -amyloidowych. Ponadto, w badaniu przeprowadzonym na myszach Tg2576, wysokie stężenia S100B zwiększały aktywność β -sekretazy i przetwarzanie amyloidogennego APP.[74] Inkubacja komórek nerwowych z glukozą lub insuliną nie spowodowała statystycznie istotnej zmiany w zewnątrzkomórkowych poziomach białka S100A8. Największą redukcję odnotowano po zastosowaniu 50nM insuliny, a największy wzrost po inkubacji z 100nM insuliną. Jeśli chodzi o cytoplazmatyczne poziomy białka S100A8, największy

wpływ zaobserwowano po podaniu glukozy. „Stan przedcukrzycowy” (50 mM glukozy) i cukrzycowy (100 mM glukozy) spowodowały odpowiednio 40% i 69% supresję wewnątrzkomórkowych poziomów białka S100A8. Insulina indukowała różne odpowiedzi w zależności od jej stężenia. W warunkach fizjologicznych (1 nM) i hiperinsulinemicznych (100 nM) zanotowano odpowiednio o ok. 14% i 7% wyższe poziomy wewnątrzkomórkowego białka S100A8. Tymczasem odwrotny efekt obserwowano po inkubacji z 50nM insuliną, przy niższych o ok. 20% stężeniach białka S100A8 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. W analizie współczynników korelacji, stwierdzono pozytywny trend między poziomami komórkowymi S100B i S100A8 w stanach przedcukrzycowych (50 mM glukozy i 50 nM insuliny) oraz po dodaniu 100mM glukozy. Efekt ten nie był tak silny w stanach hiperinsulinemicznych. Dodatkowo, zaobserwowano ujemną korelację między zewnątrzkomórkowymi poziomami S100B a komórkowymi stężeniami S100A8. Obserwacja ta jest zgodna z negatywnym związkiem obserwowanym między komórkowymi poziomami białek S100B i S100A8 w supernatantach w prawie wszystkich badanych warunkach eksperymentalnych. Ponadto współczynnik korelacji między tymi białkami a $A\beta_{40}$ w warunkach hiperglikemicznych wskazuje, że wewnątrzkomórkowa akumulacja $A\beta_{40}$ może prowadzić do aktywacji ekspresji białka S100B i jego transportu do przedziału zewnątrzkomórkowego. Odmienną sytuację zaobserwowano w przypadku $A\beta_{42}$, gdzie zaobserwowano ujemne korelacje między stężeniem $A\beta_{42}$ i S100B w lizatach i supernatantach. W odniesieniu do S100A8 i amyloidów sytuacja jest mniej jasna, chociaż wydaje się, że zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe stężenia obu form amyloidu miały negatywny związek z poziomami S100A8. Niemniej jednak wzorzec korelacji między amyloidami a białkami rodziny S100 jest podobny. Być może wskazuje to na modulowanie wzajemnego oddziaływania między tymi białkami, chociaż potwierdzenie tego wymagałoby bardziej dogłębnej analizy ścieżek, za pomocą których mogłyby one współdziałać na siebie.

W ostatnim etapie badań poddaliśmy analizie fluorescencyjnej morfologie dojrzałych neuronów jak i markery neurogenezy. Wykazaliśmy, że różne stężenia glukozy i/lub insuliny tylko nieznacznie wpływały na ekspresję badanych markerów. Statystycznie istotny wzrost średniej intensywności fluorescencji dla NeuN uzyskano po inkubacji z 100 mM glukozą i podczas inkubacji z fizjologicznymi poziomami insuliny (1 nM). Barwienie Doublecortin wykazało tylko niewielkie, ale statystycznie istotne fluktuacje intensywności fluorescencji w warunkach hiperglikemicznych i hiperinsulinemicznych. Może to być związane z krótkim okresem inkubacji (24 h), który był niewystarczający dla procesu tak skomplikowanego jak wydłużenie dendrytyczne i aksonalne. Bardziej zróżnicowane wyniki uzyskano dla przeciwciał

MAP2 i S100B. Efekt był jeszcze bardziej uderzający w przypadku barwienia S100B po inkubacji z 100mM glukozą, z fluorescencją o około 50% niższą w porównaniu do komórek nie-traktowanych niczym. Natomiast stany hiperinsulinemiczne zwiększyły fluorescencję o 22% w porównaniu z komórkami kontrolnymi i o 78% w porównaniu ze stanami fizjologicznym (1nM insuliną). Taki dwukierunkowy wpływ środowiska cukrzycowego (100 mM glukozy i 100 nM insuliny) na intensywność fluorescencji białka S100B jest zgodny z wcześniej opisanymi dwiema funkcjami modalnymi tego białka, które są zależne od stężenia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w tkance mózgowej. Dane uzyskane ze współczynników korelacji potwierdzają udział S100B w procesach różnicowania oraz w tworzeniu wypustek neuronalnych.

Cel szczegółowy – Ocena wpływu $A\beta_{40}$ oraz $A\beta_{25-35}$ na proliferację, poziom H_2O_2 , $A\beta_{42}$, S100A8, S100B, protruzję neuronów i neurogenezę w warunkach hyperinsulinemii i glikemii.

[P6] Kubis-Kubiak A., Wiatrak B., Piwowar A. (2023) Comparison of physiological state and conditions imitating the comorbidity of type 2 diabetes with Alzheimer's disease. The impact on: proliferation, H_2O_2 , $A\beta_{42}$, S100A8, S100B levels, neuronal protrusion and neurogenesis. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research 2023;80(4) DOI (not registered): 10.32383/appdr/171296 (przyjęta do druku)

W kolejnej części badań zajęłam się tematyką możliwego powiązania między interakcjami rodziny białek S100 z $A\beta_{25-35}$ w świetle chorób współistniejących takich jak cukrzyca i choroby neurodegeneracyjne. Wielofunkcyjna rodzina białek wiążących wapń S100 wywiera zarówno działanie neurotroficzne, jak i szkodliwe, w sposób zależny od stężenia i lokalizacji. Białko S100B powiązane z rolą prozapalną w późnych stadiach AD, jednak wykazano wiele nowych funkcji ochronnych przed agregacją $A\beta$ i tworzeniem neurotoksycznych oligomerów [94] Wiadomo również, że S100B hamuje agregację $A\beta_{42}$ i białka tau. [87,88] Białko S100A8 jest ligandem dla RAGE czy $A\beta$ a ekspresjonowane jest w mikrogleju, neuronach i astrocytach. RAGE pośredniczy w transporcie $A\beta$ z krążenia przez barierę krew-mózg, regulując w ten sposób jego agregację w mózgu. [89] Są doniesienia naukowe, iż inkubowanie rekombinowanego S100A8 z komórkami SH-SY5Y zwiększało wytwarzanie $A\beta_{42}$ i zmniejszało wytwarzanie $A\beta_{40}$. [90] W naszej poprzedniej pracy wykazaliśmy, że hiperglikemia i insulinemia wpływają na zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe poziomy białek S100B i S100A8 w neuronach. W niniejszym badaniu chcieliśmy stworzyć warunki przypominające środowisko „cukrzycy typu 3” [99], poprzez traktowanie komórek neuronalnych wysokim stężeniem glukozy lub insuliny w obecności fizjologicznej ($A\beta_{40}$) lub toksycznej ($A\beta_{25-35}$) formy $A\beta$. Ponadto zbadaliśmy, w

jaki sposób takie warunki wpływają na poziomy białek S100B i S100A8 w zróżnicowanych komórkach SH-SY5Y jako modelach neuronów dopaminergicznych. Opierając się na warunkach zoptymalizowanych w poprzednich badaniach, zastosowaliśmy 100 mM glukozę oraz 1 μ M i 100 μ M stężenia insuliny. Jako referencyjną, nietoksyczną formę amyloidu wybraliśmy A β ₄₀, o którym wiadomo, że odgrywa rolę fizjologiczną u zdrowych osób. W celu ustalenia optymalnego stężenia fizjologicznych i toksycznych form A β wykonaliśmy test XTT. Do dalszych badań wybrano 1 μ M A β ₄₀ i 1 nM A β ₂₅₋₃₅, ponieważ wykazywały najniższy wpływ cytotoksyczny na żywotność komórek. Inkubowaliśmy A β ₄₀ lub A β ₂₅₋₃₅ z wysokimi poziomami glukozy lub insuliny i zmierzaliśmy poziomy H₂O₂, zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe poziomy A β ₄₂ oraz poziomy białek S100B i S100A8 w komórkach neuronalnych. Ponadto ocenialiśmy wpływ różnych form amyloidu i ich koinkubacji z wysokim stężeniem glukozy lub insuliny na neurytogenezę i ekspresję markera plastyczności synaptycznej. Zakładaliśmy, że współistnienie znacznych ilości glukozy lub insuliny z A β ₂₅₋₃₅ w mikrośrodowisku komórkowym może prowadzić do nadmiernej aktywacji procesów prozapalnych, co może być istotne w fazie prodromalnej AD. Hiperglikemia (100 mM glukozy) pogłębiła działanie cytotoksyczne obu postaci amyloidu. Natomiast wysokie poziomy insuliny odwracały cytotoksyczne działanie A β ₂₅₋₃₅ bez wpływu lub nawet z niewielkim pozytywnym wpływem na żywotność komórek w przypadku wspólnej inkubacji z A β ₄₀. Pomiar aktywności proliferacyjnej potwierdził silniejszy negatywny wpływ A β ₂₅₋₃₅ na metabolizm neuronów w porównaniu z danymi uzyskanymi dla fizjologicznego A β . Co ciekawe, w pomiarze poziomu H₂O₂ wykryto przeciwstawne działanie glukozy i insuliny na ten proces. W warunkach hiperglikemii z A β ₄₀ stężenie H₂O₂ nie jest podwyższone, a w przypadku toksycznej postaci A β nawet spada. W warunkach hiperinsulinemii aktywność H₂O₂ była statystycznie istotnie wyższa po zastosowaniu obu form A β . H₂O₂ indukowany insuliną wspomaga stymulację receptorów insuliny w neuronach posiadających mitochondria wrażliwe na insulinę. W ten sposób bezpośrednie powiązanie molekularne między dysfunkcją mitochondriów a nieregularną aktywacją receptora insuliny może prowadzić do dalszej insulinooporności. W kolejnym eksperymencie analizowałam stężenia A β ₄₂ w supernatantach i lizatach komórkowych. Inkubacja A β ₄₀ doprowadziła do statystycznie istotnego wzrostu wewnątrzkomórkowego i w konsekwencji zmniejszenia zewnątrzkomórkowego stężenia A β ₄₂. Podobnie jak w przypadku wyników uzyskanych dla poziomów H₂O₂, warunki hiperinsulinemiczne stymulowały akumulację A β ₄₂ w neuronach inkubowanych wspólnie z A β ₄₀, jak również z A β ₂₅₋₃₅. Znaczący wzrost uzyskano w lizatach komórkowych neuronów traktowanych A β ₂₅₋₃₅, co potwierdza hipotezę, że ta toksyczna postać może służyć jako macierz w patogenicznym szlaku amyloidowym prowadzącym do akumulacji A β ₄₂ w neuronach. Niestety,

pomiar stężeń białka S100A8 w warunkach imitujących współistnienie cukrzycy typu 2 z AD oraz w porównywalnym środowisku fizjologicznym nie wykazała istotnych różnic. Istnieją dane wskazujące na znaczenie białka S100A8 w rozwoju AD, ponieważ jego ekspresja wzrasta wraz z wiekiem oraz jest to białko amyloidogenne jednak wymaga ono bardziej dokładniejszych badań potencjalnych szlaków, przez które wpływa na metabolizm neuronalny.[91] Interesujące wyniki uzyskano analizując poziomy zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego białka S100B. Fizjologiczny amyloid, jak również jego forma toksyczna, powodowały podobny wzór statystycznie istotnego zewnątrzkomórkowego napływu białka S100B i towarzyszącego mu wypływu cytozolowego. Dane te wzmacniają teorię, że S100B w wysokich stężeniach zewnątrzkomórkowych może działać jako cytokina prozapalna dodatkowo wspierając toksyczne działanie $A\beta_{25-35}$. W przypadku $A\beta_{40}$ równoczesny stan hiperglikemii prowadził do zahamowania działania $A\beta$, podczas gdy współistnienie z $A\beta_{25-35}$ powodowało głównie wzrost zewnątrz- i wewnątrzneuralnych stężeń białka S100B w porównaniu do samego $A\beta_{25-35}$. Insulina inkubowana razem z fizjologicznym $A\beta$ miała modulujący wpływ na zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe poziomy białka S100B. Niskie stężenie generowało statystycznie istotne wyższe stężenie białka S100B na zewnątrz neuronów wraz ze znacznym wypływem z komórki, podczas gdy wyższe stężenie miało efekt odwrotny. Jednoczesna inkubacja z insuliną i toksycznym $A\beta$ zmniejszyła poziom zewnątrzkomórkowego białka S100B w porównaniu z samym $A\beta_{25-35}$. W lizatach komórkowych efekt był podobny. Analiza współczynnika korelacji statystycznej wykazała silniejszy negatywny trend pomiędzy poziomami $A\beta_{42}$ i S100B po zastosowaniu $A\beta_{25-35}$ w porównaniu z fizjologiczną formą. S100B jest jednym z najliczniej występujących białek rozpuszczalnych w mózgu (0,5%), dodatkowo istnieją badania wykazujące akumulację S100B w pobliżu płytek amyloidowych. Nasze dane potwierdzają hipotezę, że S100B może działać jako modulator i stabilizator wewnętrznej homeostazy neuronów, szczególnie u pacjentów ze współistniejącą cukrzycą typu II i neurodegeneracyjnymi zmianami komórkowymi. Kolejnym parametrem ocenianym w naszej pracy był wpływ na dojrzałe wypustki neuronalne i neurytogenezę. Statystycznie istotny pozytywny wpływ na dojrzałe wypustki miała inkubacja z fizjologicznym $A\beta$ i w warunkach hiperinsulinemii. Toksyczny $A\beta$ nie wpływał na ten proces w sposób istotny statystycznie. Może to wynikać z faktu, że komórki inkubowano jedynie przez 24 godziny, co może być zbyt krótkim okresem czasu, aby zaobserwować i mieć wpływ na ten złożony proces. Podobne obserwacje poczyniłam w przypadku oceny neurytogenezy. Wydaje się, że proces ten jest aktywowany w środowisku zawierającym fizjologiczny $A\beta$ z wysokimi stężeniami glukozy, podczas gdy zmniejszoną neurytogenezę za-

obserwowano po ko-inkubacji toksycznej formy A β z wysokimi stężeniami glukozy czy insuliny. Według naszej wiedzy jest to pierwszy przypadek przeprowadzenia takiej analizy w przypadku warunków imitujących dwie choroby współistniejące

4.5 Podsumowanie głównych wyników opisanych w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe.

Uzyskane wyniki z zakresu analizy mechanizmów patofizjologicznych leżących u podstaw progresji choroby Alzheimer'a ze szczególnym uwzględnieniem wpływu zaburzeń metabolicznych, zebrane w cyklu publikacji zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego, przyczynią się do poszerzenia wiedzy o możliwych kierunkach poszukiwania potencjalnych terapii oraz nowych biomarkerów we wczesnym diagnozowaniu AD.

Metabolizm glukozy w tkance nerwowej spada podczas zaburzeń neurodegeneracyjnych w sposób progresywny, specyficzny dla regionu i choroby. Badania wykazały, że hiper-glikemia pozakomórkowa wpływa na funkcjonowanie wrażliwych na adenozyntroójfosforan kanałów potasowych zlokalizowanych w neuronach i astrocytach. Ponadto hiperinsulinemia przyczynia się do powstawania i progresji AD poprzez współzawodnictwo z A β o enzym rozkładający insulinę. Rozpad A β jest zależny od szlaku kinazy 3-fosfatydyloinozytolu, a zwiększone stężenie insuliny w krążeniu prowadzi do akumulacji A β . Związek między T2DM a rozwojem AD nie został w pełni wyjaśniony i pomimo licznych badań w ostatnich latach nadal wysuwa się wiele hipotez. Obecnie przyjmuje się, że insulinooporność, upośledzony metabolizm glukozy w mózgu i procesy amyloidogenne prowadzą do postępujących procesów neurodegeneracyjnych. Rzeczywiście, uważa się, że upośledzona homeostaza glukozy zwiększa odkładanie się blaszek starczych oraz splątków neurofibrylarnych, co może przyczyniać się do manifestacji wczesnych objawów klinicznych. W swoich badaniach wykazałam silnie toksyczny wpływ zaburzeń energetycznych na metabolizm neuronalny i potencjalną neuroprotekcijną rolę białka S100B oraz ich udział w zaburzeniach metabolicznych prowadzących do neurodegeneracji i rozwoju AD. Zaobserwowałam iż średnie i wysokie stężenia glukozy naśladujące stan przedcukrzycowy i cukrzycowy powodowały statystycznie istotne wydzielanie białka S100b i S100A8 do przedziału zewnątrzkomórkowego neuronów dopaminergicznych. Ponadto wzorce współczynników korelacji między tymi białkami wykazują podobne powiązania, co podkreśla możliwą skuteczną i modulującą rolę rodziny S100 w zaburzeniach metabolicznych występujących w zaburzeniach neuropatologicznych. Uzyskane dane wskazują, że przewlekła hiperglikemia lub insulinemia wpływają na metabolizm neuronów dopaminergicznych, a

zwłaszcza wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe stężenia białek z rodziny S100. Wydzielane przez komórki nerwowe w warunkach toksyczności wywołanej przez glukozę lub insulinę, białka z rodziny S100 mogą mieć działanie neuroprotektoryjne i zapewniać przetrwanie neuronów.

Podsumowując analizowane odkrycia opisują one wzajemne oddziaływania nawet niewielkich, lokalnych wahań w stężeniu glukozy lub insuliny i różnych form A β . Ta współzależność może być szczególnie istotna w środowisku silnie zależnym od energii, charakteryzującym tkankę neuronową. Kolejną ważną implikacją jest możliwa rola białek z rodziny S100 w homeostazie metabolicznej tkanki neuronowej. Może to w przyszłości doprowadzić do opracowania nowego, potencjalnie diagnostycznego biomarkera komórkowych zmian neuropatologicznych związanych z postępem choroby Alzheimera. Związek między "cukrzycą typu 3" a rodziną białek S100 wymaga dalszych badań w celu wyjaśnienia mechanizmów działania i ustalenia, czy białka te mogą być celem diagnostycznych lub terapeutycznym dla tych współistniejących jednostek chorobowych.

Bibliografia

1. Haass C. (2004). Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *The EMBO journal*, 23(3), 483–488
2. Chatterjee, S. & Mudher, A. (2018). Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes: A Critical Assessment of the Shared Pathological Traits. *Frontiers in neuroscience*, 12, 383
3. Alonso, A. D. et al. (2018). Hyperphosphorylation of Tau Associates With Changes in Its Function Beyond Microtubule Stability. *Front. Cell. Neurosci.*, 12:338
4. Laßek M. et al. (2013) Amyloid precursor proteins are constituents of the presynaptic active zone. *J. Neurochem.* 127:48-56
5. Wang, Z. et al. (2009) Presynaptic and Postsynaptic Interaction of the Amyloid Precursor Protein Promotes Peripheral and Central Synaptogenesis. *J. Neurosci.* 29:35
6. Terry, A.V., Jr. & Buccafusco, J.J. (2003) The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 821–827
7. Ferreira-vieira, T.H. et al. (2006) Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* 14, 101–115
8. Kroner Z. (2009) The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern. Med. Rev.* 14;4:373 – 379
9. Ribe, E.M., Lovestone, S., (2016) Insulin signalling in Alzheimer's disease and diabetes: from epidemiology to molecular links. *J. Intern. Med.* 280;5: 430-442
10. Schuh, A.F. et l. (2011) Mechanisms of brain aging regulation by insulin: implications for neurodegeneration in late-onset alzheimer's disease. *ISRN Neurol.* 2011, 1–9
11. De la Monte, S.M. et al. (2009) Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10, 1049–1060
12. Reddy, P.H. et al. (2014) Inhibitors of mitochondrial fission as a therapeutic strategy for diseases with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J. Alzheimers Dis.* 40, 245–256
13. Lester-Coll, N. et al. (2006) Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 9, 13–33
14. Ferreira, L. et al. (2018) Insulin resistance in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* 12, 830

15. Steen, E. et al. (2005) Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease—is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers Dis.* 7, 63–80
16. Talbot, K. et al. (2012) Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 122, 1316–1338
17. Kandimalla, R. et al. (2016) Is alzheimer's disease a type 3 diabetes? A critical appraisal. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 1078–1089
18. Salas, I.H., De Strooper, B. (2018) Diabetes and alzheimer's disease: a link not as simple as it seems. *Neurochem. Res.*44: 1271–1278
19. DeFronzo, R.A. et al. (2015) Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Prim* 1: 15019
20. Yang, Y., Song, W. (2013) Molecular links between Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neuroscience.* 250: 140-150
21. Caselli, R.J. et al. (2008) Correlating cerebral hypometabolism with future memory decline in subsequent converters to amnestic pre-mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* 65, 1231–1236
22. Langbaum, J.B.S. et al. (2010) Hypometabolism in Alzheimer-affected brain regions in cognitively healthy latino individuals carrying the apolipoprotein E ϵ 4 allele. *Arch. Neurol.* 67, 462–468
23. Mosconi, L. et al. (2008) Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 180–195
24. Matsuzaki, T. et al. (2010) Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease: the Hisayama study. *Neurology* 75, 764–770
25. Beeri, M.S. et al. (2005) Type 2 diabetes is negatively associated with Alzheimer's disease neuropathology. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 60, 471–475
26. Heitner, J., Dickson, D.W., 1997. Diabetics do not have increased Alzheimer-type pathology compared with age-matched control subjects: a retrospective post-mortem immunocytochemical and histofluorescent study. *Neurology* 49, 1306–1311
27. Sonnen, J.A. (2009) Different patterns of cerebral injury in dementia with or without diabetes. *Arch. Neurol.* 66, 315–322
28. Ahtiluoto, S., et al. (2010) Diabetes, Alzheimer disease, and vascular dementia: a population-based neuropathologic study. *Neurology* 75, 1195–1202
29. Gao, C., et al. (2013) New animal models of Alzheimer's disease that display insulin desensitization in the brain. *Rev. Neurosci.* 24, 607–615
30. Li, Z.G., et al. (2007) Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes. *Diabetes* 56, 1817–1824
31. Takeda, S., et al. (2010) Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and A β deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7036–7041
32. Seaquist, E.R. et al. (2001) The effect of insulin on in vivo cerebral glucose concentrations and rates of glucose Transport/Metabolism in humans. *Diabetes* 50, 2203–2209
33. Kim, B., Feldman, E.L., (2015) Insulin resistance as a key link for the increased risk of cognitive impairment in the metabolic syndrome. *Exp. Mol. Med.* 47:149
34. Peng, D. et al. (2013) Hyperphosphorylation of tau protein in hippocampus of central insulin-resistant rats is associated with cognitive impairment. *Cell. Physiol. Biochem.* 32, 1417–1425.
35. Crane, P.K. et al. (2013) Glucose levels and risk of dementia. *N. Engl. J. Med.* 369, 540–548.
36. Convit, A. (2005) Links between cognitive impairment in insulin resistance: an explanatory model. *Neurobiol. Aging.* 26;1: 31-35
37. An, Y., et al. (2017) Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 14;3: 318-329
38. Valente, T. et al. (2010) Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiol. Dis.* 37, 67–76.
39. Li, X.H. et al. (2012) AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiol. Aging* 33, 1400–1410
40. Babić, M. et al. (2014) Update on the core and developing cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer disease. *Croat. Med. J.* 4: 347–365
41. Nobili, F.; Morbelli, S. (2014) [18F]FDG-PET as a Biomarker for Early Alzheimer's Disease. *Open Nucl. Med. J.* 2, 46–52
42. Kavanagh, K. et al. (2019) Type-2-Diabetes Alters CSF but Not Plasma Metabolomic and AD Risk Profiles in Vervet Monkeys. *Front. Neurosc.* 13:843

43. Gupta, A. et al. (2018) To Investigate Role of Glycosylated Hemoglobin (HbA1c) as a Biomarker for Prediction of Dementia and Cognitive Dysfunction in Type 2 Diabetic Patients. *J. Alzheimer Dis. Park.* 8;2
44. Luciano R. et al. (2015) Biomarkers of Alzheimer disease, insulin resistance, and obesity in childhood. *Pediatrics* 135;6: 1074-1081
45. Chetram Deochand MT. (2013) CSF and Brain Indices of Insulin Resistance, Oxidative Stress and Neuro-Inflammation in Early versus Late Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis Park* 3:128
46. Steiner J et al. (2011) S100B protein in neurodegenerative disorders. *Clin Chem Lab Med* 49;3:409-424
47. Mrak RE, Griffin WST. (2001) The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22;6: 915-922
48. Marshak DR. et al. (1992) Increased S100 β neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiol Aging* 13;1:1-7
49. Petzold A, et al. (2003) Cerebrospinal fluid S100B correlates with brain atrophy in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 336;3: 167-170
50. Businaro R. et al. (2006) S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against A β amyloid-induced neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases A β amyloid neurotoxicity at high doses. *J Neurosci Res* 83;5:897-906
51. Ribe T. et al. (2010) Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Glia* 58;3:300-314
52. Rothermundt M. et al. (2007) Glial cell activation in a subgroup of patients with schizophrenia indicated by increased S100B serum concentrations and elevated myoinositol. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 31;2: 361-364
53. Michetti F. et al. (2012) The S100B protein in biological fluids: More than a lifelong biomarker of brain distress. *J Neurochem* 120;5: 644-659
54. Chaves ML. et al. (2010) Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *J Neuroinflammation* 7;6
55. Peskind ER. et al. (2001) Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 39;5-6:409-413
56. Nooijen PTGA. et al. (1997) Neuron-specific enolase, S-100 protein, myelin basic protein and lactate in CSF in Dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 8;3
57. Lam V. et al. (2013) The serum concentration of the calcium binding protein S100B is positively associated with cognitive performance in older adults. *Front Aging Neurosci* 5;61
58. Kheirouri S. et al. (2018) Association of S100B Serum Levels with Metabolic Syndrome and its Components. *Act Med Port* 31:201-6
59. Gerlach R. et al. (2006) Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience* 141;4:1697-1701
60. Duan, X.-H.N. (2015) Current Situation of PC12 Cell Use in Neuronal Injury Study. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind* 4, 61-66
61. Lee, Y.-W. et al. (2013) NGF-Induced Cell Differentiation and Gene Activation Is Mediated by Integrative Nuclear FGFR1 Signaling (INFS). *PLoS ONE* 8, e68931
62. Westerink, R.H.S.; Ewing, A.G. (2007) The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol* 192, 273-285
63. Geetha, T. et al. (2013) Nerve Growth Factor Receptor TrkA, a New Receptor in Insulin Signaling Pathway in PC12 Cells. *J. Boil. Chem.* 288, 23807-23813
64. Brett, J. et al. (1993) Survey of the Distribution of a Newly Characterized Receptor for Advanced Glycation End Products in Tissues. *Am. J. Pathol.* 143, 1699-1712
65. Drubin, D.G. (1985) Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly-promoting factors. *J. Cell Biol.* 101, 1799-1807
66. Das, K.P. et al. (2004) Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: A comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 397-406
67. Shmueli, O. et al. (2001) DCX in PC12 cells: CREB-mediated transcription and neurite outgrowth. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1061-1070
68. Yu, Y. et al. (2020) A pilot study on searching for peri-nuclear NeuN-positive cells. *PeerJ* 8, e8254
69. Cannon, J.R.; Greenamyre, J.T. (2009) NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 464, 14-17
70. Nardin, P. et al. (2007) S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem. Int.* 50, 774-782

71. Ahlemeyer, B. et al. (2000) S-100 β protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 858, 121–128
72. Arcuri, C. et al. (2005) S100B Increases Proliferation in PC12 Neuronal Cells and Reduces Their Responsiveness to Nerve Growth Factor via Akt Activation. *J. Biol. Chem.* 280, 4402–4414
73. Christl, J. (2019) Association of Cerebrospinal Fluid S100B Protein with Core Biomarkers and Cognitive Deficits in Prodromal and Mild Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 72, 1119–1127
74. Mori T. et al. (2010) Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Glia* 58;3:300-314
75. Sreejit G. et al. (2020) S100 family proteins in inflammation and beyond. *Adv. Clin. Chem* 98;173-231
76. Gonzalez LL. et al. (2020) Role of S100 proteins in health and disease. *BBA Mol. Cell Res.* 1867; 118677
77. Vogl T. et al. (2007) Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* 13;1042-1049
78. Zhang L. (2011) S100B attenuates microglia activation in gliomas: possible role of STAT3 pathway. *Glia*, 59;486-498
79. Villarreal A., et al. (2014) S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive gliosis. *J. Neurochem*, 131;190-205
80. Adami C. et al. (2004) S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain. *Biochim. Biophys. Acta* 1742;169-177
81. Contini C. et al. (2022) Salivary proteomics reveals significant changes in relation to Alzheimer's disease and aging. *J. Alzheimer's Dis.*, 89;605-622
82. Lim RR. et al. (2019) Correlation between systemic S100A8 and S100A9 levels and severity of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Syndr.*, 13;1581-1589
83. Walker DG. Et al. (2006) Gene expression changes by amyloid beta peptide-stimulated human postmortem brain microglia identify activation of multiple inflammatory processes. *J. Leukoc. Biol.* 79;596-610
84. Lodeiro M. et al. (2017) Aggregation of the inflammatory S100A8 precedes A β plaque formation in transgenic APP mice: positive feedback for S100A8 and A β production. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 72;319-328
85. Y. An, et al. (2018) Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.*, 14, pp. 318-329
86. Cristóvão, J. S., & Gomes, C. M. (2019). S100 Proteins in Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 13, 463
87. Cristóvão, J. S. et al. (2018). The neuronal S100B protein is a calcium-tuned suppressor of amyloid- β aggregation. *Science advances*, 4(6), eaaq1702
88. Moreira, G. G. et al. (2021). Dynamic interactions and Ca²⁺-binding modulate the holdase-type chaperone activity of S100B preventing tau aggregation and seeding. *Nature communications*, 12(1), 6292
89. Deane, R. et al. (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nature medicine*, 9(7), 907–913.
90. de la Monte, S. M., & Wands, J. R. (2008). Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *Journal of diabetes science and technology*, 2(6), 1101–1113
91. Peña, L. A. et al. (1995). beta-Amyloid regulates gene expression of glial trophic substance S100 beta in C6 glioma and primary astrocyte cultures. *Brain research. Molecular brain research*, 34(1), 118–126

5. Informacje o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej wraz z omówieniem pozostałego dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

5.1 Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora wraz z informacją o współpracach krajowych i międzynarodowych.

Prace badawcze prowadzone przeze mnie przed uzyskaniem stopnia doktora, przede wszystkim były skupione na poznaniu mechanizmu działania kompleksu białkowego bogatego w Prolinę (PRP), znanego również pod nazwą kolostrynina - wykazującego działanie terapeutyczne w AD. Tabletki lub kapsułki zawierające kolostryninę są dostępne w wielu krajach na świecie i są sprzedawane jako suplement diety OTC pod różnymi nazwami handlowymi, w tym Colostrinin[®], MemoryAid, CogniSure, Cognase, Cognate, Memory Protect czy Dyna. Część eksperymentalną przeprowadzałam w Laboratorium Immunochemii Ogólnej IITD PAN w ramach trzyletniego grantu badawczego oraz rocznego stypendium naukowego Fundacji Rodziny R&K Hoppenbrouwers-Migacz.

Kolostrynina została po raz pierwszy wyizolowana z siary owczej w 1974 roku przez prof. M. Janusz z IITD PAN, a następnie scharakteryzowana biochemicznie i biologicznie. PRP wykazuje aktywność regulacyjną w: indukcji cytokin, wpływa na odpowiedzi komórkowe, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, przywraca równowagę w komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Posiada zdolność do hamowania nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu i tlenu azotu. Biorąc pod uwagę rolę układu odpornościowego w patogenezie AD oraz zarówno immunotropową, jak i regulacyjną aktywność PRP wspomagającą wydzielanie cytokin i reaktywnych form tlenu, zaproponowano potencjalne działanie terapeutyczne kompleksu PRP w AD. Wartość kliniczną zgłoszono we wstępnym badaniu z podwójną kontrolą (ślepą próbą i placebo), w którym podawanie doustne tabletki zawierającej 100µg PRP, poprawiało wyniki testów psychologicznych pacjentów z AD i zapobiegało dalszemu pogorszeniu stanu ogólnego zdrowia. Co najważniejsze, podawanie kompleksu PRP skutkowało stabilizacją funkcji poznawczych i poprawą zdolności do wykonywania rutynowych czynności domowych. Aby uzyskać dalszy wgląd w mechanizm działania kompleksu PRP, postanowiłam zbadać jego wpływ na różnicowanie i aktywność fagocytarną komórek monocytowych/ makrofagowych. Dostarczyłam dowodów na to, iż fenotypowe (ekspresja markerów CD11b i CD14) oraz funkcyjne (fagocytoza) różnicowanie komórek HL-60 zmniejsza się odpowiednio o około 22%, 40% i 60-64% w obecności kompleksu PRP dodanego do komórek jednocześnie z czynnikiem różnicującym. Tego efektu nie obserwowano podczas stosowania preparatu kontrolnego, takiego jak poli-L-proliny lub albuminy surowicy wołowej. Kompleks PRP nie miał wpływu na różnicowanie komórek THP-1 wykazujących cechy komórek już częściowo zróżnicowanych (wyższy poziom ekspresji CD11b i CD14 oraz zdolność do fagocytowania). Dowiodłam, iż kompleks PRP jest czynnikiem specyficznym modyfikującym wczesne fenotypowe i funkcjonalne etapy procesu różnicowania komórek. Podczas badań nad komórkami HL-60 i THP-1 wykazałam, że po stymulacji induktorami procesów zapalnych, komórki te nie wydzielają

tlenku azotu i reaktywnych form tlenu. Badanie wpływu kompleksu PRP na indukcję wydzielania cytokin, w przypadku komórek HL-60 różnicowanych witaminą D₃, po dodaniu jednocześnie z czynnikiem różnicującym, hamuje ekspresję genów dla interleukiny 1 β i czynnika martwicy nowotworów α (odpowiednio o 44% i 39%). Podobnie jak w przypadku eksperymentów badających wpływ na proces fagocytozy i ekspresji markerów różnicowania, efekt działania kompleksu PRP był zauważalny we wczesnych stadiach różnicowania oraz swoisty (brak efektu po zastosowaniu poli-L-proliny lub albuminy surowicy wołowej). Badania te, przeprowadzone podczas mojego pierwszego roku pracy doktorskiej, zostały opublikowane w wysokopunktowanym czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu. Prowadziłam również badania nad wpływem kompleksu PRP na poziom Ca²⁺ w cytozolu w odniesieniu do obserwowanych w AD zaburzeń homeostazy wapnia. Odkryłam, że wzrost poziomu Ca²⁺ indukowany przez N-formylometionylo-leucylo-feniloalaninę (fMLP) lub zagregowaną, toksyczną formę A β ₄₂ był hamowany przez jednoczesne dodanie kompleksu PRP. Porównanie indukcji poziomu Ca²⁺ przez fMLP w obecności lub bez związku helatującego (kwas egtazynowy, EGTA) sugeruje, że wzrost wolnych jonów wapnia w komórkach był spowodowany przez fMLP/A β ₄₂, które powodują otwarcie kanałów jonowych umożliwiające napływ jonów do komórki. Uzyskane wyniki wskazują, że kompleks PRP może uczestniczyć w regulacji aktywacji kanałów jonowych. Wysoka zawartość reszt proliny i aminokwasów hydrofobowych w składzie aminokwasowym kompleksu PRP sugeruje, że peptydy ten może hamować agregację A β ₄₂, a także powodować dezagregację już istniejących złogów amyloidu. Monitorując agregację i tworzenie struktur włóknistych poprzez zmiany w widmach dichroizmu kołowego, wykazałam, że podczas agregacji następuje powstanie konformacja przypadkowej struktury cewki (ang. random coil structure) w arkuszu β . W widmach CD zachodzi zmiana w obecności fragmentu nonapeptydowego PRP (NP), który oddziałuje z A β ₄₂, hamując przejście konformacyjne z struktury przypadkowej cewki do β arkusza. Wpływ NP na agregację i dezagregację A β ₄₂ zaobserwowałam również poprzez porównanie interkalacji tioflawiny T w struktury arkuszy β . Analizowałam obrazy pod mikroskopem sił atomowych paratów wolnych od agregatów i częściowo zagregowanych inkubowanych przez 1-6 dni z NP lub bez NP. Co więcej, uzyskane wyniki sugerują, że m.in. działanie terapeutyczne kompleksu PRP/Kolostryliny może być związane nie tylko z hamującym wpływem jednego ze składników całego kompleksu – NP, na agregację, ale może również wywołać solubilizację powstających wcześniej złogów amyloidowych. Uzyskane wyniki są zgodne z hipotezą, że kompleks PRP ma zdolność ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym i jego dalszymi konsekwencjami oraz podkreślają jego

przydatność w zapobieganiu i/lub leczeniu chorób związanych z wiekiem. Badania przeprowadzone w pracy doktorskiej realizowałam jako wykonawca w ramach grantów KBN oraz byłam stypendystą fundacji Barbary i Rudolfa Hoppenbrouwers (**G1-G2**). Uzyskane wyniki badań były podstawą do stworzenia publikacji oryginalnych, które zostały opublikowane w wysokopunktowanych czasopismach (**H1-H3**) Badania te były również przedstawiane na sympozjach krajowych i zagranicznych (**C1-3**). W trakcie studiów doktoranckich prowadziłam również zajęcia ze studentami III roku kierunku Biotechnologii na Wydziale Biologii (teraz Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Brałam również udział w warsztatach pt.: "Wykrywanie i analiza sekwencji kwasów nukleinowych" (2004) w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu Poznańskiego we współpracy z Akademią Rolniczą, Katedrą Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Poznań. Byłam koordynatorem 38 Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (2002) oraz Dolnośląskiego Festiwalu Nauki (1998-2000).

H1. Janusz M., Woszczyzna M., Lisowski M., Kubis A., Macała J., Gotszalk T., Lisowski J. (2009) Ovine colostrums nanopeptide affects amyloid beta aggregation. *FEBS Letters*, 583 (1): 190-196

H2. Kubis A. (2008). Alzheimer Disease – experimental models and new prospects in therapy. *Arch. Imm. Ther. Exp.*, 62: 372-392 (in polish)

H3. Kubis A., Marcinkowska E., Janusz M., Lisowski J. (2005). Studies on the mechanism of action of a proline-rich polypeptide complex (PRP): Effect on the stage of cell differentiation. *Peptides*, 26(11): 2188-2192

C1. Kubis A., Janusz M. (2007) Studies on mechanism of action of proline-rich polypeptide (PRP) – effect on cytokine induction. Poster presentation on 8th International AD/PD Conference, Salzburg, Austria.

C2. Kubis A., Marcinkowska E., Janusz M., Lisowski J. (2004) Studies on mechanism of action of proline-rich polypeptide (PRP) – effect on phagocytosis. Poster presentation on 29th Meeting of Federation of European Biochemical Societies, Warsaw, Poland

G1. Stypendium Fundacji Rodziny Hoppenbrouwers (2007–2008) – beneficjent dotacji

G2. Grant badawczy pt.: "Badania nad mechanizmem działania PRP/Colostriny – preparatu wykazującego terapeutyczne efekty w chorobie Alzheimer'a." (Nr. 4PO5A01518) Komitetu Badań Naukowych MEiN, grant doktorancki (2003–2007) członek zespołu badawczego

5.2 Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora wraz z informacją o współpracach krajowych i międzynarodowych.

Moim drugim osiągnięciem w ramach pracy habilitacyjnej są badania realizowane podczas pobytu w Laboratorium Neuropatologii na Oddziale Neurologii V Narodowego Instytutu Neurologicznego (Mediolan, Włochy). Po uzyskaniu stopnia doktora postanowiłam zdobyć doświadczenie poza granicami Polski oraz nauczyć się nowych technik, zwłaszcza związanych z modelami zwierzęcymi AD. Brałam udział w sprawdzeniu następujących hipotez:

- (i) analiza potencjalnego występowania specyficznej heterogeniczności molekularnej a co za tym idzie możliwość wyodrębnienia wyraźnych profili agregatów A β
- (ii) określenie cech molekularnych charakteryzujących odrębne profile agregatów A β
- (iii) analiza różnic w profilach molekularnych wpływających na właściwości fizykochemiczne agregatów A β , które mogą być zaangażowane w generowanie różnych fenotypów AD.

We współpracy z Skirball Transgenice Facility w NY University School of Medicine, USA wygenerowaliśmy transgeniczną linię myszy z mutacją A673V pod kontrolą sekwencji promotora Thy1.2 (APPit), które zostały wykorzystane do dalszych badań. Założyłam hipotezę, że podobnie jak u homozygotycznych nosicieli mutacji APPit, zaobserwujemy u myszy wczesne odkładanie się toksycznych form A β , zaś ekspresja ludzkiego dzikiego typu APP wraz z APPit zapobiegnie amyloidogenezie natomiast mutacja APPit zahamuje amyloidogenezę, gdy będzie ekspresjonowana razem z APP^{SWE} u myszy APP23. Nasze badania koncentrowały się na jednym z aspektów molekularnych, które mogą prowadzić do generowania różnic w właściwościach strukturalnych złogów A β , które z kolei mogą być zaangażowane w generowanie odrębnych fenotypów AD. Ta heterogeniczność jest bardzo złożonym zjawiskiem, którego molekularne podstawy są nadal w dużej mierze niezbadane. Ostatnio korelacja między strukturą fibryli A β a zmianami fenotypu AD została wykazana za pomocą pomiarów magnetycznego rezonansu jądrowego w stanie stałym w strukturach fibryli zbudowanych z A β ₄₀ i A β ₄₂ wyizolowanych z homogenatów tkanki mózgowej pozyskanej od pacjentów z AD. Badania te wykazały, że istnieje jakościowa różnica między agregatami A β w tkance mózgowej pacjentów z AD i że ta różnica może powodować generowanie odrębnych fenotypów. W czasie mojego pobytu odkryłam, że zarówno w sporadycznych, jak i genetycznie zdeterminowanych formach AD, agregaty amyloidowe wykazują różnice w składzie biochemicznym form A β . Takie różnice są związane ze zmianami w kinetyce agregacji, opornością na degradację przez proteazy, aktywnością rozprzestrzeniania się *in vitro* i zdolnością do indukowania procesów amyloidogennych w modelach zwierzęcych. Odkryliśmy, że A β jest wytwarzany począwszy od różnych mieszanin peptydów A β , które uczestniczą w składzie biochemicznym amyloidu. Heterogeniczne formy A β mogą podlegać różnorodnym szlakom agregacji, generując złogi A β , które wykazują różne właściwości toksyczne, w zależności od przebiegu fazy opóźnienia i

wzrostu w ich kinetyce agregacji. Wykazują one również zmienność w aktywności siewnej na monomerycznym A β ₄₂ jako substracie, która zależy od powinowactwa nasiono-substrat podczas procesu polimeryzacji. Agregaty złożone z różnych form A β mają rozbieżną odporność na degradację przez proteazy, dając początek agregatom, które mogą mieć różną stabilność czy toksyczność *in vivo*. Różne formy A β mają zróżnicowaną zdolność hamowania lub przyspieszania procesu amyloidogenezy w zwierzęcych modelach AD oraz powodują powstanie charakterystycznych profili złogów amyloidowych u myszy, którym wstrzyknięto homogenaty tkanki nerwowej z ludzkiego mózgu. Zaobserwowane przez mnie zjawiska potwierdzają hipotezę, że zmienność fenotypów AD może wynikać z istnienia potencjalnie dużej ilości modyfikacji agregatów A β . W związku z tym szczegółowa analiza właściwości agregacji i wysiewu A β może prowadzić do nowej klasyfikacji AD, opartej na identyfikacji podtypów odrębnych agregatów makromolekularnych A β . Podczas pobytu na stażu Post-Doc pracowałam ze zwierzętami transgenicznymi – myszami z mutacją białka APPit (A673V) oraz APP23, przygotowywałam pobrany materiał/tkanekę nerwową do dalszych badań, wykonywałam barwienia immunohistopatologiczne oraz zdjęcia na mikroskopie fluorescencyjnym, które następnie analizowałam. Dodatkowo oprócz pracy typowo eksperymentalnej byłam odpowiedzialna za badania diagnostyczne. Wykonywałam oznaczenia poziomu białka 14.3.3 w CSF pacjentów z podejrzeniem choroby Creutzfeldt- Jakob'a stosując rozdział elektroforetyczny białek a następnie Western-Blot z przeciwciałami przeciwko białku 14.3.3. Do diagnostyki pacjentów z różnymi formami chorób degeneracyjnych oznaczałam poziom A β ₄₀, A β ₄₂, białka tau całkowitego oraz jego ufosforylowanej formy za pomocą testów ELISA. Wszystkie tego badania, ze względu na kontakt z materiałem zakaźnym, przeprowadzałam, po odpowiednim przeszkoleniu, w laboratorium o podwyższonym stopniu bezpieczeństwa (BSL-3). Byłam jedynym obcokrajowcem w laboratorium składającym się z ok. 20 pracowników co wymagało dużej elastyczności w komunikacji i współpracy. Badania przeprowadzone w ramach stażu poddoktorskiego realizowałam jako wykonawca w ramach 6 grantów narodowych i międzynarodowych (G3-G8). Uzyskane wyniki badań były również przedstawiane na sympozjach krajowych i zagranicznych (C1-3) oraz były podstawą do stworzenia wielośrodkowej publikacji oryginalnej, która została opublikowana w wysokopunktowanym czasopiśmie.(H4)

G3. "Marker biologici di neurodegenerazione" (2008-2009) członek zespołu badawczego

G4. "Genoproteomics of age related disorders" – (2009) członek zespołu badawczego

G5. "Fattori di rischio genetico e indicatori biologici periferici di conversione da mild cognitive impairment a malattia di Alzheimer" (2010) członek zespołu badawczego

- G6.** "Novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease and other amyloidoses.: analysis of their efficacy in transgenic *C. elegans* expressing human proteins" (2011) członek zespołu badawczego
- G7.** „Mechanism of neurodegeneration and phenotypic heterogeneity in inherited prion diseases: pathophysiological involvement of prion proteins in membrane trafficking and signal-ing” (2011) członek zespołu badawczego
- G8.** "Trans-suppression of Abeta amyloidogenesis in cellular and nematode models” (2012) członek zespołu badawczego
- G9** "Bad gene, good gene: a recessive APP mutation can be both” (2012) członek zespołu badawczego
- G10** "Development of Alzheimer disease therapeutics based on natural variant of Amyloid beta that hinders amyloidogenesis” (2013) członek zespołu badawczego

H4. Di Fede G., Catania M., Maderna E., Ghidoni R., Benussi L, Tonoli E., Giaccone G., Moda F., Paterlini A., Campagnani I., Sorrentino S., Colombo L., Kubis A., Bistaffa E., Ghetti B., Tagliavini F. (2018) Molecular subtypes of Alzheimer's disease. *Sci.Rep.* 8;3269

C1. Diomede L., Salmona M., Catania M., Romeo M., Stravalaci M., Moda F., Kubis A., Tagliavini F., DiFede G. (2011) Bad gene, good gene: recessive APP mutation can be both. Prezentacja ustna dla Fundacji Theleton w ramach Grantu realizowanego w latach 2010-2013: Nuove prospettive terapeutiche per la malattia di Alzheimer basate su una variante di Abeta che inibisce l'amiloidogenesi

C2. Di Fede G., Ghidoni R., Catania M., Giaccone G., Benussi L., Moda F., Gobbi M., Moro M., Kubis A., Ruggerone M., Ghetti B., Binetti G., Salmona M., Tagliavini F (2012). Phenotypic heterogeneity of Alzheimer's disease: towards the identification of molecular determinants underlying distinct clinico-pathological subgroups. Plakat na międzynarodowej konferencji - Alzheimer 's Association International Conference, (Vancouver, British Columbia, USA) *Alzheimer's and Dementia*, 8(4) Suppl.:P653

C3. Di Fede G., Catania M., Giaccone G., Ghidoni R., Albertini V., Moda F., Kubis A., Moro M., Ruggerone M., Tagliavini F. (2012) Phenotypic heterogeneity of Alzheimer's disease: towards the identification of molecular determinants underlying distinct clinico-pathological subgroups. Prezentacja ustna na VII konferencji krajowej SINDem - Associazione autonoma aderente alla Societa Italiana di Neurologia per le demenze (Neapol, Włochy)

Po prawie 5-letnim stażu podoktorskim oraz rocznym urlopie macierzyńskim, w październiku 2014 roku wygrałam konkurs na stanowisko adiunkta w Katedrze i Zakładzie Toksykologii, Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Zostałam również kierownikiem Pracowni Toksykologii Molekularnej, gdzie do dzisiaj prowadzę badania neurotoksykologiczne na liniach komórkowych. Zainteresowałam się tematyką współistnienia chorób układu nerwowego ze szczególnym naciskiem na wpływ zmian metabolicznych na rozwój chorób neurodegeneracyjnych. By wdroić się w tematykę napisałam publikację przeglądową,

która została opublikowana w wysokopunktowanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym: Kubis A., Piwowar A (2015) The new insight on the regulatory role of the vitamin D3 in metabolic pathways characteristic for cancerogenesis and neurodegenerative diseases. Ageing Res.Rev. 24 part B;126-137 IF:7,526 Pkt. MEiN:45. Zostałam również opiekunem pomocniczym dwóch prac magisterskich prowadzonych przez prof. J. Saluk, które skupiały się na potwierdzeniu badaniami biochemicznymi symulacji komputerowych wykonywanych we współpracy z Wojskową Akademią Techniczną w Łodzi. Badania wykonane metodami bioinformatycznymi, polegającymi na komputerowym określeniu stopnia powinowactwa niektórych polifenoli do acetylocholinoesterazy wykazały, że istnieją polifenole, które przyłączają się ściśle do centrum aktywnego tego enzymu, a ich powinowactwo do tego enzymu jest silniejsze niż bojowych środków toksycznych takich jak sarin. Celem pracy była ocena wpływu badanych polifenoli (sylibina, naringenina, hesperetyna, apigenina, bajkaleina i diosmetyna) na aktywność acetylocholinesterazy w trzech układach badawczych:

- a. inkubacja krwi pełnej z polifenolem
- b. inkubacja osocza z polifenolem
- c. inkubacja czystego (komercyjnie dostępnego) enzymu z polifenolem

Jako kontrolę pozytywną użyliśmy donepezylu, leku stosowanego w chorobach demielinizacyjnych typu stwardnienie rozsiane, czy w AD.

Aby zapewnić sobie źródło finansowania dalszych planowanych eksperymentów, w 2015 r. napisałam projekt grantowy pt.: "The interaction between multi-edged sword of vitamin D₃ and Pin1 in cancer and neuropathological disorders" w ramach Installation Grant EMBO. Planowałam w nim badania interakcji pomiędzy szlakami metabolicznymi wit. D₃ a aktywnością białka Pin1 w modelach badawczych AD oraz nowotworu piersi. Niestety nie uzyskałam finansowania w ramach tego projektu a kolejne półtora roku wykorzystałam na urlop macierzyński i wychowawczy.

Po powrocie w październiku 2018 r. złożyłam wniosek konkursowy w programie Miniatura 2 (nr rej. 2018/02/X/NZ3/03393) pt.: „Współwystępowanie cukrzycy typu II z chorobami neurodegeneracyjnymi. Badanie in vitro wpływu hiperglikemii oraz hiperinsulinemii na metabolizm białek z rodziny S100 - potencjalnych markerów rozwoju choroby Alzheimera'a.” Zaobserwowane przez innych naukowców zależności pomiędzy zaburzeniami metabolicznymi związanymi z T2DM, a szlakami wpływającymi na funkcjonowanie neuronów były podstawą proponowanego przeze mnie badania naukowego tj. analizy jakościowej i ilościowej wybranych białek S100 w warunkach glukotoksyczności oraz hiperinsulinemii w modelowych ludz-

kich liniach neuronalnych SH-SY5Y. Nieuzyskałam pozytywnej opinii dotyczącej finansowania tego projektu. Napisałam również kolejną pracę przeglądową (P1), która została opublikowana w wysokopunktowanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym a wchodzi w skład pracy habilitacyjnej. Zostałam zaproszona do współpracy z prof. I. Fecką z Katedry i Zakładu Farmakognozji Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, która polegała na analizie potencjalnego działania hamującego związków pochodzenia roślinnego (kwercytyny, taksyfoliny i luteoliny) na aktywność α -amylazy w surowicy krwi pacjentów z różnymi zaburzeniami metabolizmu glukozy. Większość eksperymentów dotyczących modulującego wpływu polifenoli na aktywność α -amylazy przeprowadzono na dostępnych na rynku izolowanych enzymach. Kilka badań przeprowadzono przy użyciu modeli zwierzęcych, jeszcze mniej eksperymentów przeprowadzono na enzymie z trzustki zwierzęcej i prac analizujących aktywność α -amylazy z ludzkich próbek biologicznych jest nie wiele. Ze wszystkich badanych flawonoidów najciekawsze wyniki uzyskałam po inkubacji z luteoliną. Wydają się, że luteolina może działać w inny sposób niż kwercetyna i taksyfolina, co może być powiązane z różnicami strukturalnymi między tymi związkami. Ponieważ dane *ex vivo* oferują jedynie cząstkowe informacje, skuteczność polifenoli u ludzi wymaga dalszych badań, a mechanizm leżący u podstaw musi zostać szczegółowo scharakteryzowany. Nasze badania były jednym z niewielu, które wykorzystywały α -amylazę ludzkiej surowicy, a zatem prawdopodobnie będą bardziej istotne dla ludzi niż osoby stosujące komercyjnie dostępną α amylazę trzustkową lub świńską. Prace badawcze te zakończyły się przygotowaniem plakatu konferencyjnego: Matera-Witkiewicz A., Kubis-Kubiak A., Laskowski M., Fecka I., Kozera Ł., Piwowar A. (2018) Wrocław Medical University Biobank: biosharing of biological samples for scientific purposes. Towards comprehensive population studies - Białystok PLUS. Białystok, s.[23-24]; oraz napisaniem publikacji pt.: Examination of selected polyphenols as modulators of alpha-amylase activity in patients with different stage of carbohydrate metabolism disturbances“, która jest przygotowana do wysłania do wysokopunktowanego czasopisma o międzynarodowym zasięgu.

W dniach 21–23.06.2018 uczestniczyłam w Workshop on Integrative Approaches in Neurodegeneration organizowane w ramach działań konsorcjum FlySMALS, finansowanych w ramach międzynarodowego projektu JPND 2013 “European research projects for Cross-Disease Analysis of Pathways related to Neurodegenerative Diseases” gdzie prezentowałam plakat pt.: Kubis-Kubiak A., Di Fede G., Piwowar A. Relations between pleomorphic A β assemblies and distinct AD phenotypes. s.49 poz. P12. W 2018 r. złożyłam również wniosek o stypendium Funduszu im. E. Niedźwirskiego, który wykorzystałam do udziału w Konferencji The Brain Conferences "Understanding and targeting Alzheimer's disease" w Rungstedgaard, Denmark

(5-8.05.2019). Prezentowałam plakat pt.: Kubis-Kubiak A., Piwowar A. "Comorbidity of diabetes with neurodegenerative diseases. In vitro study of the influence of hyperglycaemia and -insulinaemia on the metabolism of S100B protein - a potential marker for Alzheimer's disease." s.43. Rozpoczęłam również prace nad publikacją przeglądową, która stanowi część pracy habilitacyjnej a została opublikowana w wysokopunktowanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (P2). Równocześnie w latach 2018-2019 zaplanowałam i rozpoczęłam badania nad rolą białek z rodziny S100 w AD.

W 2019 r. nawiązałam współpracę z dr L. Smirnową (Environmental Health and Engineering, Bloomberg School of Health, Johns Hopkins University, Baltimore, USA), która jest światowej sławy specjalistką w zakresie opracowywania nowych, bardziej predykcyjnych i istotnych dla człowieka metod *in vitro* w neurotoksykologii rozwojowej. Jako jedna z pierwszych opublikowała standardowe procedury operacyjne tworzenia organoidów mózgowych pochodzących z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych. Poza tym, interesuje się molekularnymi mechanizmami odpowiedzi komórkowej na stres środowiskowy. W ramach środków uzyskanych ze Stypendium Funduszu Naukowego OS2 RID finansowanych z projektu pt.: "Wrocławski Uniwersytet Medyczny jako Regionalne Centrum Doskonałości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu" udało mi się wyjechać na staż badawczy do Laboratorium Center of Alternatives to Animal Testing w Johns Hopkins University, USA. Głównym celem pobytu było zapoznanie się z najnowocześniejszymi technikami *in vitro* stosowanymi w badaniach toksykologicznych oraz zainicjowanie współpracy międzynarodowej. Szkoliłam się z zakresu neurotoksyczności: ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym oraz specyficznych dla OUN, analizy uwalniania chemokin, cytokin i czynników wzrostu, oceny mielinizacji i zmian morfologicznych neuronów. Zaplanowano także projektowanie przyszłych eksperymentów z zastosowaniem tego modelu w badaniach w jednostce macierzystej. Brałam też udział w spotkaniach z przedstawicielami laboratoriów prowadzących badania z zakresu proteomiki oraz neurotoksykologii. Od 2019 nawiązałam również współpracę z dr. B. Wiatrak z Katedry i Zakładu Farmakologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Współpraca ta owocowała wieloma pracami badawczymi uwieńczonymi, między innymi, publikacjami oryginalnymi wchodzącymi w skład pracy habilitacyjnej (P3-P6) oraz publikacją oryginalną nt. wpływu trzech isoform amyloidu ($A\beta_{25-35}$, $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$) w stężeniach zbliżonych do poziomów fizjologicznych na stres oksydacyjny wywołany podawaniem lipopolisacharydu lub kokulturowaniem z komórkami mikrogleju - Wiatrak B., Jawień P., Matyszewska A., Szeląg A., Kubis-Kubiak A. (2022) Effect of amyloid- β on the redox system

activity in SH-SY5Y cells preincubated with lipopolysaccharide or co-cultured with microglia cells. *Biomed & Pharmacotherapy* 149;112880 IF:7.419 Pkt. MEiN 100.

W 2020 roku również złożyłam wniosek grantowy do konkursu Miniatura 4 (Nr. rej. 2020/04/X/NZ3/01672) w Narodowym Centrum Nauki; pt.: „Analiza wpływu różnych form A β na metabolizm i lokalizację transporterów glukozy na zróżnicowanej linii komórkowej SH-SY5Y.” Podstawą proponowanego przeze mnie badania naukowego była analiza wpływu różnych form A β na metabolizm i lokalizację transporterów glukozy w ludzkich zróżnicowanych komórkach neuroblastoma SH-SY5Y. Projekt grantowy nie został zakwalifikowany do finansowania. W związku z ogólnoswiatowym trendem zastępowania badań na zwierzętach laboratoryjnych i zmniejszania ich liczby UE wydała dyrektywę (Directive 2010/63/EU) w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych; po raz pierwszy w prawodawstwie UE; określona została zasada „3R” (zastąpienie, zmniejszenie, udoskonalenie), która stała się wymogiem prawnym przy prowadzeniu badań. Do najnowszych alterantów dla badań na zwierzętach zalicza się m.in. metody screeningu o dużej wydajności (ang. high content screening, HCS), które uprościły jednoczesną identyfikację oraz kwantyfikację różnych procesów komórkowych. Umożliwiają one równoległe pozyskiwanie wielu informacji na poziomie molekularnym, komórkowym, tkankowym czy nawet w małych organizmach (np.: Danio pręgowany). Ze względu na swoją uniwersalność system ten pozwala na przeprowadzanie badań immunocytochemicznych, skringu RNAi, testowania genów reporterowych fluorescencji komórkowej, nokautu genów za pośrednictwem CRISPR/Cas9 czy badań nad interakcjami białko-białko. Obecnie systemy HCS są uważane za ważne narzędzia wspierające odkrywanie i opracowywanie leków, w tym: identyfikację celów, potwierdzenie wtórne, identyfikowanie "cząsteczki wiodącej" czy mechanizmu działania. Ponadto systemy HCS są stosowane jako narzędzia w toksykologii *in vitro* do testowania toksyczności związków i wyjaśniania mechanizmu jego działania, znacznie zmniejszając użycie zwierząt w badaniach toksykologicznych. Badania na zwierzętach są kosztowne, cechuje je niska przepustowość i oraz uzyskiwanie niespójnych wyników w przewidywaniu toksyczności u ludzi. Specyficzne dla celu, ukierunkowane na mechanizm testy *in vitro* w połączeniu z modelami obliczeniowymi są obiecujące w wyjaśnianiu złożonych mechanizmów toksyczności i określaniu priorytetów związków do dalszych dogłębnych badań toksykologicznych. Mając na uwadze powyższe doniesienia i kierując się chęcią poprawy jakości prowadzonych przeze badań oraz stworzeniem możliwości prowadzenia badań przedklinicznych złożyłam w 2020 r. wniosek inwestycyjny (Nr. rej. IA/SP/488316/2021) do Narodowego Centrum Nauki na sfinansowanie zakupu kompletnego wysokoprzepustowego systemu do obrazowania wieloparametrycznego Opera Phenix Plus,

który jest automatycznym mikropłytkowym mikroskopem konfokalnym o wysokiej przepustowości przeznaczonym do badań HCS. Umożliwia on rejestracje, analizowanie i zarządzanie obrazami w trybach fluorescencyjnym, konfokalnym, jasnego pola i z cyfrowym kontrastem fazowym. Wniosek ten zajął 160 miejsce na liście rankingowej spośród 460 złożonych.

Poszukując możliwości sfinansowania części badań zaplanowanych dla doktorantki Pani prof. Piwowar, Pani mgr Katarzyny Lipke w ramach jej pracy doktorskiej w 2021 roku złożyłam wniosek grantowy do NCN pt.: „Ocena wpływu kwasu palmitynowego na metabolizm komórek SH-SY5Y i HMC3” w konkursie Miniatura 5 (Nr. rej. 2021/05/X/NZ7/00703). Celem planowanych badań pilotażowych była odpowiedź na pytanie, czy i jak środowisko lipotoksyczne wpływa na funkcjonowanie komórek wchodzących w skład ludzkiego mózgu? Jaki wpływ mają na wewnątrzkomórkowe, kanoniczne szlaki sygnałowe, biorą udział w pośredniczeniu szlaku sygnałowego insuliny (aktywacja/fosforylacja PI3K p85, ERK 1/2, p38 MAPK i JNK), na ekspresję receptorów insulinowych (IR, IGF-1R) w celu sprawdzenia potencjalnego wpływu na ekspresję transporterów kwasów tłuszczowych w komórkach budujących system nerwowy. Mimo pozytywnych ocen, projekt ten nie został zakwalifikowany do finansowania.

W 2021 r. zostałam zaproszona przez dr hab. E.M. Kratz, prof UMW z Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu do współtworzenia publikacji przeglądowej opisującej badania nad zastosowaniem sirtuin jako potencjalnych markerów prognostycznych wybranych stanów patologicznych. Efektem tej współpracy jest publikacja przeglądowa w wysokopunktowanym czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym: Kratz E.M., Sołkiewicz K., Kubis-Kubiak A., Piwowar A. (2021) Sirtuins as important factors in pathological states and the role of their molecular activity modulators. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 22;2,630 IF:5,923 Pkt. MEiN:140. Również w 2021 r. rozpoczęłam współpracę z dr. Wojciechem Fortuną z Kliniki Neurochirurgii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu. Celem wspólnych badań było przede wszystkim przetestowanie metod hodowli komórek izolowanych z opuszki węchowej z wykorzystaniem materiałów i odczynników certyfikowanych do użytku farmaceutycznego (GMP) w produkcji produktu zaawansowanej terapii komórkowej przeznaczonej dla ludzi oraz próba zastosowania tych komórek do regeneracji uszkodzenia rdzenia kręgowego. Regeneracja całkowicie uszkodzonego rdzenia kręgowego wciąż stanowi wyzwanie we współczesnej medycynie. Obiecującą metodą leczenia jest autologiczny przeszczep komórek otoczki węchowej (OEC). Wyniki uzyskane podczas badań zostały opisane w publikacji oryginalnej - Fortuna W., Wiatrak B., Jawień P., Kubis-Kubiak A., Ying L., Daqing L., Tabakow P. (2022) Three-dimensional scaffolds of acid-solubilized collagen and pepsin-solubilized collagen in cultures of olfactory ensheathing cells

used in the cellular product for the regeneration of severed spinal cord. *In Vivo*. 36(5), 2032–2041 IF:2.155 Pkt. MEiN 40

Poszukując możliwości rozwoju naukowego w 2022 r. złożyłam wniosek grantowy w konkursie Miniatura 6 (Nr. rej. 2022/06/X/NZ7/00552) Narodowego Centrum Nauki pt.: „Modelowanie zaburzeń neuropatologicznych w naczyniu - generowanie i charakteryzowanie organoidów mózgu oraz asembloidów o różnych tożsamościach regionalnych.” Celem tego projektu jest staż naukowy oraz nawiązanie współpracy z dr Fabio Cavaliere, dyrektorem Biomedical Platform for Human Research w „Achucarro” Basque Center for Neuroscience Research, Bilbao, Hiszpania. Laboratorium to zajmuje się badaniami mechanizmów regeneracji komórek i ich znaczeniu w neurodegeneracji i urazach OUN, zwłaszcza w chorobie Parkinsona i niedokrwieniu mózgu. Badania skupiają się na roli astrocytów jako mediatorów metabolizmu i żywotności neuronów. Stosowane przez nas modele eksperymentalne mogą obejmować hodowle *in vitro* neuronalnych komórek macierzystych dorosłych szczurów po pluripotencjalne komórki macierzyste pochodzące od pacjentów (iPS). Po uzyskaniu pozytywnej oceny wniosku zaplanowałam 3 tygodniowy (19.06 - 07.07.2023) staż badawczy, podczas którego zaznajamiałam się z tematyką badań prowadzonych w laboratorium ze szczególnym naciskiem na badania na ludzkich iPS komórkach neuronalnych oraz ludzkich organoidach mózgowych. Na tych ostatnich wykonałam również badania sprawdzające hipotezę potencjalnego działania terapeutycznego ekstraktu z kory francuskiej sosny nadmorskiej (*Pinus Pinaster*, Pycnogenol®) w leczeniu zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD). Wydaje się, iż Pycnogenol® może działać jako inhibitor wychwytu zwrotnego noradrenaliny, podobnie jak lek drugiego wyboru na ADHD (atomoksetyna). Uzyskane wyniki będą podstawą pracy oryginalnej, która będzie jendocześną podstawą do obrony pracy magisterskiej w roku 2023/24. W jednostce macierzystej przeprowadzimy dodatkowe badania na uzyskanych supernatantach i organoidach inkubowanych z badanymi substancjami. Celem mojego wyjazdu było zaimplikowanie poznanych metod w badaniach prowadzonych w jednostce macierzystej oraz wypracowanie nowych kierunków wspólnych badań.

Pozostałe publikacje oryginalne i prace przeglądowe

1. Sośnicka, A., Piwowar A., Kubis-Kubiak A. Effect of Pycnogenol® on neuritogenesis and synaptic transport in brain organoids. Investigation of the potential therapeutic effect in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. (w przygotowaniu)

2. Kubis-Kubiak A., Wiatrak B., Piwowar A. Development and optimization of a quick, simple and effective method for the isolation and cultivation of neuronal and astrocytic cells obtained from frozen animal material. (w przygotowaniu)
3. Lipke K., Kubis-Kubiak A., Piwowar A. (2023) The influence of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on microglial activity, lipid content and fatty-acid-binding proteins levels. *Advances in Medical Science* (w recenzji)
4. Fortuna W., Wiatrak B., Jawień P., Kubis-Kubiak A., Ying L., Daqing L., Tabakow P. (2022) Three-dimensional scaffolds of acid-solubilized collagen and pepsin-solubilized collagen in cultures of olfactory ensheathing cells used in the cellular product for the regeneration of severed spinal cord. *In Vivo*. 36(5), 2032–2041 IF:2.155 Pkt. MEiN 40
5. Lipke K., Kubis-Kubiak A., Piwowar A. (2022) Molecular mechanism of lipotoxicity as an interesting aspect in the development of pathological states - current view of knowledge. *Cells* 11;5, 844 IF:7.666 Pkt. MEiN 140
6. Wiatrak B., Jawień P., Matuszewska A., Szelağ A., Kubis-Kubiak A. (2022) Effect of amyloid- β on the redox system activity in SH-SY5Y cells preincubated with lipopolysaccharide or co-cultured with microglia cells. *Biomed & Pharmacotherapy* 149;112880 IF:7.419 Pkt. MEiN 100
7. Kratz E.M., Sołkiewicz K., Kubis-Kubiak A., Piwowar A. (2021) Sirtuins as important factors in pathological states and the role of their molecular activity modulators. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 22;2,630 IF:5,923 Pkt. MEiN:140
8. Di Fede G., Catania M., Maderna E., Ghidoni R., Benussi L, Tonoli E., Giaccone G., Moda F., Paterlini A., Campagnani I., Sorrentino S., Colombo L., Kubis A., Bistaffa E., Ghetti B., Tagliavini F. (2018) Molecular subtypes of Alzheimer's disease. *Sci.Rep.* 8;3269 IF:4,011 Pkt. MEiN:40
9. Rorbach-Dolata A., Kubis A., Piwowar A. (2017) Modyfikacje epigenetyczne - ważny mechanizm w zaburzeniach cukrzycy *Post. Hig. Med. Dośw.* 71; 960-974 IF:0,783 Pkt MEiN:15
10. Kubis A., Piwowar A (2015) The new insight on the regulatory role of the vitamin D3 in metabolic pathways characteristic for cancerogenesis and neurodegenerative diseases. *Ageing Res.Rev.* 24 part B; 126-137 IF:7,526 Pkt. MEiN:45

Udział w międzynarodowych lub krajowych konferencjach naukowych

1. Dyba A., Kubis-Kubiak A., Piwowar A. (2019) Analogies in pathogenesis of Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. W:3rd Wroclaw Scientific Meetings. Wrocław, 1-2.03.2019 ; Wrocław : Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s.67 poz. P13
2. Kubis-Kubiak A., Piwowar A. (2019) Comorbidity of diabetes with neurodegenerative diseases. In vitro study of the influence of hyper- glycaemia and -insulinaemia on the metabolism of S100B protein - a potential marker for Alzheimer's disease development. The Brain Conferences "Understanding and targeting Alzheimer's disease". Rungstedgaard, Denmark, 5-8.05.2019; s.43
3. Kubis-Kubiak A., Di Fede G., Piwowar A. (2018) Relations between pleomorphic A β assemblies and distinct AD phenotypes. Abstracts presented at the Workshop on Integrative Approaches in Neurodegeneration. Lisboa, Portugal, s.49 poz. P12
4. Matera-Witkiewicz A., Kubis-Kubiak A., Laskowski M., Fecka I., Kozera Ł., Piwowar A. (2018) Wroclaw Medical University Biobank: biosharing of biological samples for scientific purposes. Towards comprehensive population studies - Białystok PLUS. Białystok, 13-14.04.2018; s.23-24
5. Rorbach-Dolata A., Kubis A., Oleksy M., Piwowar A. (2015) Neuronal glucotoxicity of human brain. The 10th International Conference of Young Naturalists "From biotechnology to environmental protection" - The Interdisciplinary Meeting of Young Naturalists. Zielona Góra, Poland, 12-15.11.2015; Zielona Góra : The Biologist Scientific Union of University of Zielona Góra, 2015; s.84 ISBN 978-83-943745-0-1
6. Rorbach-Dolata A., Kubis A., Piwowar A. (2015) Cancer vs. Neurodegeneration - inverse comorbidity association. W:Puzzel 2015 - IV Wrocławska Konferencja Studentów Nauk Technicznych i Ścisłych. Wrocław, 18-19.04.2015; s.181
7. Di Fede G., Ghidoni R., CataniaM., Giaccone G., Benussi L., Moda F., Gobbi M., Moro M., Kubis A., RuggeroneM., Ghetti B., Binetti G., Salmona M., Tagliavini F (2012). Phenotypic heterogeneity of Alzheimer's disease: towards the identification of molecular determinants underlying distinct clinico-pathological subgroups. Plakat na Konferencji AICAD 2012
8. Di Fede G., CataniaM., Giaccone G., Ghidoni R., Albertini V., Moda F., Kubis A., Moro M., Ruggerone M., Tagliavini F. (2012) Phenotypic heterogeneity of Alzheimer's disease: towards the identification of molecular determinants underlying distinct clinico-pathological subgroups. Plakat na XLIII Congresso Nazionale di Societa Italiana di Neurologia, Sindem Rimini, Italia 6-9.10.2012

9. Diomede L., Salmona M., Catania M., Romeo M., Stravalaci M., Moda F., Kubis A., Tagliavini F., DiFede G. (2011) Bad gene, good gene: recessive APP mutation can be both. Plakat na spotkaniu Theleton 2011

Współpraca naukowa wewnętrzna

1. Współpraca z Katedrą Farmakologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (dr B. Wiatrak) w zakresie badań nad wpływem trzech fragmentów amyloidu: A β ₂₅₋₃₅, A β ₁₋₄₀ i A β ₁₋₄₂ w stężeniach zbliżonych do poziomów fizjologicznych na stres oksydacyjny wywołany podawaniem lipopolisacharydów lub kokulturowaniem z komórkami mikrogleju. Efektem współpracy jest publikacja: Wiatrak B., Jawień P., Matuszewska A., Szelağ A., Kubis-Kubiak A. (2022) Effect of amyloid- β on the redox system activity in SH-SY5Y cells preincubated with lipopolysaccharide or co-cultured with microglia cells. *Bio-med & Pharmacotherapy* 149; 112880
2. Współpraca z Katedrą Diagnostyki Laboratoryjnej (dr hab. E.M. Kratz, prof UMW) Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w zakresie tworzenia pracy przeglądowej z badań nad zastosowaniem sirtuin jako potencjalnych markerów prognostycznych wybranych stanów patologicznych. Efektem współpracy jest publikacja: Kratz E.M., Sołkiewicz K., Kubis-Kubiak A., Piwowar A. (2021) Sirtuins as important factors in pathological states and the role of their molecular activity modulators. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 22;2,630
3. Współpraca z Pracownia Przesiewowych Testów Aktywności Biologicznej i Gromadzenia Materiału Biologicznego (dr inż. A. Matera-Witkiewicz) Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu; w zakresie badań nad potencjalnym zastosowaniem wybranych polifenoli (kwercytiny, luteoliny i taksyfoliny) jako inhibitorów α -amylazy w surowicy pacjentów z różnymi zaburzeniami metabolizmu węglowodanów. Efektem współpracy jest prezentacja konferencyjna Matera-Witkiewicz A., Kubis-Kubiak A., Laskowski M., Fecka I., Kozera Ł., Piwowar A. (2018) Wrocław Medical University Bio-bank: biosharing of biological samples for scientific purposes. Towards comprehensive population studies - Białystok PLUS. Białystok, April 13-14, 2018; s.[23-24].
4. Współpraca z Katedra i Zakładem Farmakognozji (prof. Izabela Fecka) wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu; w zakresie badań nad potencjalnym zastosowaniem wybranych polifenoli (kwercytiny, luteoliny i taksyfoliny) jako inhibitorów α -amylazy w leczeniu cukrzycy typu 2. Efektem współpracy jest prezentacja konferencyjna Matera-Witkiewicz A., Kubis-Kubiak A., Laskowski M., Fecka I., Kozera Ł.,

Piwowar A. (2018) Wrocław Medical University Biobank: biosharing of biological samples for scientific purposes. Towards comprehensive population studies - Białystok PLUS. Białystok, April 13-14, 2018; s.[23-24].

Współpraca naukowa zewnętrzna

5. Współpraca z Kliniką Neurochirurgii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu (dr. Wojciech Fortuna) w zakresie badań nad nowatorskimi metodami leczenia uszkodzenia rdzenia kręgowego za pomocą autologicznych przeszczepów komórek otoczki węchowej. Efektem współpracy jest publikacja oryginalna: Fortuna W., Wiatrak B., Jawień P., Kubis-Kubiak A., Ying L., Daqing L., Tabakow P. (2022) Three-dimensional scaffolds of acid-solubilized collagen and pepsin-solubilized collagen in cultures of olfactory ensheathing cells used in the cellular product for the regeneration of severed spinal cord. *In Vivo*. 36(5), 2032–2041
6. Współpraca z Laboratorium Neuropatologii (dr Giuseppe di Fede) Oddziału Neurologii V Narodowego Instytutu Neurologicznego, Mediolan, Włochy; w zakresie badań nad oceną czy istnienie różnych "morfotypów" A β ma odmienne zdolności do rozprzestrzeniania procesu patologicznego *in vivo*, po wstrzyknięciu do modeli zwierzęcych. Efektem współpracy jest prezentacja konferencyjna: Kubis-Kubiak A., Di Fede G., Piwowar A. (2019) Relations between pleomorphic A β assemblies and distinct AD phenotypes. Abstracts presented at the Workshop on Integrative Approaches in Neurodegeneration. Lisboa, Portugal, 21-23 June 2018; s.49 poz. P12
7. Współpraca z Center for Alternatives to Animal Testing (dr Lena Sminorva) Johns Hopkins University, Baltimore, USA w zakresie badań nad zastosowaniem modelu komórkowego 3D "mini-brains" do analizy wpływu zaburzeń metabolicznych glukozy i insuliny na proces powstawania złogów amyloidowych. Badania trwają.
8. Badania zlecone dla firmy Hasco Lek. Stworzenie planu eksperymentów przewidzianych do realizacji w ramach badań zamawianych pt.: "Test transformacji komórkowej pod wpływem leku Urosal oraz jego aktywnych składników". Według wytycznych uzyskanych z firmy stworzyłam projekt badawczy zakładający użycie testu *in vitro* transformacji komórkowej Bhas 42 CTA według protokołu DB-ALM Protocol n°156. Badania nie ruszyły ze względu na brak finansowania w budżecie firmy.
9. Współpraca z dr Fabio Cavaliere, Dyrektorem Laboratorium Biomodel Platform for Human Research w „Achucarro” Basque Center for Neuroscience Research, Bilbao, Hiszpania w ramach nowo przyznanego grantu Miniatura 6 (Nr rejestracyjny:

2022/06/X/NZ7/00552) pt.: „Modelowanie zaburzeń neuropatologicznych w naczyniu – generowanie i charakteryzowanie organoidów mózgu oraz asembloidów o różnych tożsamościach regionalnych”. Rozpoczęcie badań.

Udział w projektach badawczych

1. Członek zespołu badawczego projektu pt.: "Marker biologici di neurodegenerazione"- RF92-CONV.71,6 MS S LUCIA, (01.10.2008 – 31.03.2009)
2. Członek zespołu badawczego projektu pt.: „Genoproteomics of age related disorders” - RA3 Cariplo-Nobel (01.04.2009 -31.12.2009)
3. Członek zespołu badawczego projektu pt.: "Fattori di rischio genetico e indicatori biologici periferici di conversione da mild cognitive impairment a malattia di Alzheimer – RF 112 MS Strategico (01.01.2010 – 31.12.2010)
4. Członek zespołu badawczego projektu pt.:”Novel therapeutic strategies for Alzheimer’s disease and other amyloidoses.: analysis of their efficacy in transgenic C. elegans expressing human proteins.” – RA53 Cariplo-Nobel (01.01.2011-30.06.2011)
5. Członek zespołu badawczego projektu pt.:”Mechanism of neurodegeneration and phenotypic heterogeneity in inherited prion diseases: pathophysiological involvement of prion proteins in membrane trafficking and signaling” RA57 (01.07.2011-31.12.2011)
6. Członek zespołu badawczego projektu pt.: "Trans-suppression of Abeta amyloidogenesis in cellular and nematode models.” – Grant Alzheimer Association (01.01.2012-31.02.2012)
7. Członek zespołu badawczego projektu pt.: "Bad gene, good gene: a recessive APP mutation can be both.” – RT 16, Telethon, (01.04.2012-31.12.2012)
8. Członek zespołu badawczego projektu pt.: "Development of Alzheimer disease therapeutics based on natural variant of Amyloid-beta that hinders amyloidogenesis.” – RF 136 (01.01.2013-11.04.2013)
9. Członek zespołu badawczego projektu naukowego pt.:“Wpływ interakcji estrogenów z metaloestrogenem na komórki gruczołu sutkowego.” realizowany w ramach środków przynanych przez Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu. Nr. wewnętrzny simple: ST.D150.18.004 (01.10.2018 - 30.09.2019)
10. Wykonawca zadania w projekcie pn. „Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu jako Regionalny Ośrodek Doskonałości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu” realizowanym w ramach środków przyznanych przez Ministerstwo Edukacji Nauki w programie „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” (RID) – nr umowy 016/RID/2018/19. Projekt ma

przyczynić się do rozwoju badań naukowych i prac rozwojowych na Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Projekt numer 016/RID/2018/2019

11. Członek zespołu badawczego projektu naukowego pt.: „Ocena zmian ekspresji wybranych białek z rodziny uroplakin (II i IIIa) w wybranych nienowotworowych chorobach urologicznych.” realizowany w ramach środków przynanych przez Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu. Nr. wewnętrzny simple: SUB.D150.21.097 (01.10.2020-30.09.2022)
12. Członek zespołu badawczego projektu naukowego pt.: „Ocena udziału wybranych ksenobiotyków w zaburzeniach równowagi redox u osób narażonych środowiskowo.” realizowany w ramach środków przynanych przez Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu. Nr. wewnętrzny simple: SUBZ.D150.22.043 (1.01.2022 -31.12.2022)
13. Członek zespołu badawczego projektu pt.: „Analiza procesów neurozapalnych i demielinizacyjnych w badaniach in vitro oraz in vivo. grant badawczy przyznany przez Wrocławski Uniwersytet Medyczny, Nr. wewnętrzny simple: SUBK.D150.22.027 (1.01.2022 - 31.12.2022)
14. Kierownik projektu pt.: „Wpływ leków z grupy odwrotnej inhibitorów odwrotnej transkryptazy na homeosaturę lipidów jako potencjalnych induktorów lipotoksyczności w komórkach nerwowych.” Grant badawczy przyznany przez Wrocławski Uniwersytet Medyczny. Nr. wewnętrzny simple: SUBK.D150.22.038 (1.01.2022 - 31.12.2022)
15. Kierownik grantu Miniatura 6 pt.: „Modelowanie zaburzeń neuropatologicznych w naczyniu – generowanie i charakteryzowanie organoidów mózgu oraz asembloidów o różnych tożsamościach regionalnych” finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki. Nr. wewnętrzny simple: MINI.D150.22.002 (1.10.2022 - 30.09.2023)

Staż badawczo-naukowe

- 1) 01.10.2008 - 15.04.2013r. Staż badawczy Post-Doc w Laboratorium Neuropatologii V, I.R.C.C.S. National Neurological Institute "Carlo Besta", Mediolan, Włochy. Prowadziłam badania przedkliniczne nad nowymi strategiami terapeutycznymi w chorobie Alzheimera. Charakteryzowałam właściwości biochemiczne mutacji A673V APP. Praca w laboratorium o podwyższonym standardzie bezpieczeństwa – BCL2. Wykonywałam testy diagnostyczne w kierunku choroby Alzheimer’a, Parkinsona, Creutzfeld’a-Jacob’a, Zespołu Gerstmann-Sträusslera-Scheinkera oraz demencji.
- 2) 28.02 - 10.03.2020r. Staż naukowy w Center for Alternatives to Animal Testing, John Hopkins University, Baltimore, MD, USA Szkolenie w zakresie rozwoju i hodowli kokultur

- organotypowych 3D takich jak: BrainSphere i LUHMES. Szkolenie z zakresu neurotoksyczności - ekspresja genów związanych ze stresem oksydacyjnym i specyficznych dla OUN, analiza uwalniania chemokin, cytokin i czynników wzrostu, ocena mielinizacji i zmian morfologicznych w neuronach. Profilowanie transkryptomu i analiza proteomiczna.
- 3) 19.06.2023 - 07.07.2023r. Staż badawczy w Laboratorium Biomodel Platform for Human Research w „Achucarro” Basque Center for Neuroscience Research, Bilbao, Hiszpania. Zapoznawałam z technikami hodowli ludzkich organoidów mózgowych. Przeprowadziłam też badania na ludzkich organoidach mózgowych sprawdzające hipotezę potencjalnego działania terapeutycznego ekstraktu z kory francuskiej sosny nadmorskiej (*Pinus Pinaster*, Pycnogenol®) w leczeniu zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD).

Nagrody i stypendia za działalność naukową.

1. 2007-2008 r. Stypendium Fundacji Rodziny Hoppenbrouwers
2. 2018 r. Stypendium Fundacji dr Emila. Niedźwirskiego
3. 2019 r. Nagroda Zespołowa I stopnia przyznana przez JM Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej.
4. 2019-2020 r. Stypendium Funduszu Naukowego OS2 RID finansowane z projektu pt.: "Wrocławski Uniwersytet Medyczny jako Regionalne Centrum Doskonałości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu"
5. 2020 r. Nagroda Zespołowa I stopnia przyznana przez JM Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej.
6. 2020 r. Nagroda Indywidualna II stopnia przyznana przez JM Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej.
7. 2021 r. Nagroda Indywidualna I stopnia przyznana przez JM Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej.
8. 2021 r. Stypendium programu Erasmus+
9. 2022 Nagroda Indywidualna I stopnia przyznana przez JM Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej.

Recenzje prac naukowych.

W okresie po doktoracie recenzowałam ponad 10 prac naukowych złożonych do publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym: *Advances in Clinical and Experimental Medicine* (IF:2.1), *Acta Biochimica Polonica* (IF:2.349), *Acta Neurobiologiae Experimentalis* (IF:1.269), *Amyloides* (IF:5.5), *Aging Cell* (IF:7.8), *Neurochemical Research* (IF:4.414).

Kursy i szkolenia

1. Szkolenie na podstawie ustawy z dnia 15.01.2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wrocław (24.01 – 03.02.2022). Obowiązujące przepisy krajowe dotyczące ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych. Zasady etyczne postępowania ze zwierzętami. Przygotowanie zwierząt do zabiegu. Metody i procedury obchodzenia się ze zwierzętami przeznaczonymi do wykorzystania lub stosowanymi w procedurach dostosowanych do danego gatunku. Podstawowe rodzaje zachowań zwierząt. Metody uśmiercania zwierząt, stosowanie wczesnego i humanitarnego zakończenia procedury. Komisje etyczne ds. doświadczeń na zwierzętach. Zasady bezpieczeństwa i higieny pracy ze zwierzętami przeznaczonymi do wykorzystania lub wykorzystywanymi w procedurach (myszy, szczury, świnka morska, królik). Standardy trzymania tych zwierząt (środowisko, klatki, pasza) i wzbogacania ich środowiska. Codzienna opieka nad zwierzętami. Identyfikacja specyficznych dla danego gatunku oznak stresu, bólu i cierpienia, które są przeznaczone do wykorzystania lub wykorzystania w procedurach. Metody znieczulenia i łagodzenia bólu. Wpływ środków znieczulających i przeciwbólowych na wynik eksperymentu.
2. Warsztaty z wykorzystania QuPath - programu do analizy obrazów mikroskopowych (13-17.06.2022) Polska Sieć Badawcza Łukasiewicz – PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii. Uzyskiwanie danych ilościowych ze zdjęć preparatów tkankowych po ich obróbce histologicznej i obrazowaniu mikroskopowym.
3. W ramach projektu „Dolnośląscy liderzy Medycyny wdrożenie zintegrowanego programu podnoszenia kompetencji studentów, doktorantów, kadry dydaktycznej i administracyjnej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu” (Program Operacyjny Wiedza Edukacja Rozwój, Oś priorytetowa: III. Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju, Działanie 3.5 Kompleksowe programy szkół wyższych) uczestniczyłam w kursie pt.: „Wprowadzenie Tutoringu jako nowego sposobu nauczania dzięki szkoleniom kadry dydaktycznej pracującej indywidualnie ze studentem”. Szkolenie obejmowało 130 godz. dydaktycznych od 24.04.2021 do 12.06.2021.

4. Warsztaty pt.: "Elementy dobrego wniosku. Projekty badawczo-innowacyjne: Research innovation action (RIA) i innowacyjne: Innovation Action (IA)". w Centrum Transferu Technologii Politechniki Wrocławskiej (13.02.2015)
5. Warsztaty pt.: "Writing individual applications - Individual Fellowships IF Marie Skłodowskiej Curie" w Centrum Transferu Technologii Politechniki Wrocławskiej (15.05.2015). Jak złożyć wniosek - Portal uczestnika. Wymagania formalne, dokumentacja konkursowa, kryteria oceny, struktura zgłoszenia.
6. Warsztaty: "Kurs wprowadzający do doświadczeń na zwierzętach skierowany do naukowców i personelu zatrudnionego w obiektach dla zwierząt". (2009) Istituto Zooprofilattico Sperimentale z Lombardia i Emilia Romagna "Bruno Umbertini" - Uniwersytet w Mediolanie, Szkoła Specjalizacji w Nauce i Medycynie Zwierząt Laboratoryjnych, Mediolan, Włochy. Placówka opieki nad zwierzętami: etyka i prawodawstwo, organizacja obiektu, charakterystyka pomieszczeń oraz kontrola parametrów środowiskowych i stanu zdrowia. Charakterystyka mikrobiologiczna, choroby odzwierzęce i kliniczne objawy choroby. Stosowana etiologia i dobrostan zwierząt. Produkcja, konserwacja i inspekcje transgenicznych kolonii myszy. Higiena, dezynfekcja i oczyszczanie środowiska. Bezpieczeństwo w testach na zwierzętach. Analgezja, znieczulenie, eutanazja i podstawowe zasady chirurgii. Sekcja zwłok i techniki pobierania próbek. Opracowanie protokołu eksperymentalnego. Statystyki zastosowane do projektu eksperymentalnego.
7. Kurs teoretyczny: "Mikroskopia sił atomowych dla materiałów biologicznych i polimerowych" (2008) Międzywydziałowe Centrum Mikroskopii Zaawansowanej (CIMA) Uniwersytetu w Mediolanie we współpracy z 2M Strumenti.
8. Warsztat: "Wykrywanie i analiza sekwencji kwasów nukleinowych". (2004) Izolacja DNA z wymazów, komórek bakterii i drożdży, transformacja komórek bakteryjnych i drożdży, oczyszczanie i klonowanie produktów PCR, SSCP, odwrotna transkrypcja, enzymatyczne sekwencjonowanie DNA - metoda Sangera. Uniwersytet Poznański, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii we współpracy z Akademią Rolniczą, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Poznań.

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

6.1 Działalność dydaktyczna

Przez okres zatrudnienia w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Wydziału Farmacji we Wrocławiu:

1. Prowadziłam zajęcia z Toksykologii dla studentów IV roku kierunku Farmacja (2014-2022)
2. Prowadziłam zajęcia z Toksykologii dla studentów IV roku kierunku Analityka Medyczna. (2022)
3. Prowadziłam zajęcia w języku angielskim i włoskim z Toksykologii dla studentów programu Erasmus (2018-2023)
4. Prowadziłam zajęcia z farmakoepidemiologii V roku kierunku Farmacji (2018-2023)
5. Prowadziłam zajęcia fakultatywne dla studentów IV roku kierunku Farmacji oraz Analityki Medycznej pt.: "Wykorzystanie techniki PCR w naukach medycznych i badaniach toksykologicznych" (2014-2016)
6. Przygotowanie konspektów zajęć dydaktycznych: szczegółowe zagadnienia z toksykologii przemysłowej oraz współtworzenie konspektu do zajęć z farmacji przemysłowej dla studentów V roku Farmacji (2015-2016)
7. Przygotowanie materiałów anglojęzycznych dla studentów programu Erasmus z tematyki: The determination of salicylates, meprobamate; the determination of free sulfonamids, the detection of antidepressants etc. (2018-2023)
8. Przygotowanie konspektów zajęć dydaktycznych: szczegółowe zagadnienia oraz współtworzenie konspektu do zajęć z toksykologii dla studentów IV roku Farmacji (2017 r., 2020r.)
9. Przygotowanie konspektów zajęć dydaktycznych: szczegółowe zagadnienia oraz współtworzenie konspektu do zajęć z farmakoepidemiologii dla studentów V roku Farmacji (2015 - 2023)
10. Przygotowanie i wygłoszenie wykładu pt. "Diagnostyka laboratoryjna chorób neurodegeneracyjnych" na kursie specjalizacyjnym „Blok VI- podsumowujący” dla diagnostów laboratoryjnych specjalizujących się w „Laboratoryjnej diagnostyce medycznej”.
11. Prowadziłam zajęcia w ramach praktyk studenckich dla studentów zagranicznych (Egipt, Turcja, Rumunia i Jordania) w ramach programu Student Exchange Program współorganizowanego przez Polskie Towarzystwo Studentów Farmacji (2022-2023)

12. Prowadziłam zajęcia w ramach praktyki zawodowej uczennic kierunku „Technik analityk” z Technikum nr 15 we Wrocławiu (2022)

Promotor prac magisterskich:

1. Pani Marty Ogorzałek pt.: „Cytotoksyczny wpływ hiperinsulinemii i hiperglikemii na aktywność białka S100B na różnicowanej linii szczurzych komórek pheochromocytooma PC12” 2019r.
2. Pani Poli Piątkowskiej pt.: „Ocena zaburzeń syntezy beta-amyloidu w warunkach hiperglikemii oraz hyperinsulinemii na różnicowanej linii szczurzych komórek pheochromocytooma PC12” 2019r.
3. Pani Aleksandry Dyby pt.: „Badanie współzależności zaburzeń metabolicznych ze stresem oksydacyjnym na różnicowanych liniach PC12.”. 2020r.
4. Pani Aliny Padushkiny pt.: „Badanie in vitro współzależności zaburzeń metabolicznych ze zmianami aktywności amyloidu beta 40.” 2020r.
5. Pani Dominiki Witkowskiej pt.: „Cytotoksyczny wpływ hiperinsulinemii i hiperglikemii na stężenie białek S100A8 i S100B w komórkach ludzkich neuronów SH-SY5Y” 2021r.
6. Pani Emilii Nowiczuk pt.: „Zmiana stężenia białka A β 1-42 w komórkach ludzkich neuronów SH-SY5Y w warunkach zwiększonej glikemii i insulinemii” 2021r.
7. Pani Katarzyny Chrustowskiej pt.: „Wpływ kwasu palmitynowego i DHA na żywotność neuronów dopaminergicznych SH-SY5Y” 2022r.
8. Pani Anny Jiménez Gallofré pt.: „Methods of storage of isolated cells from nervous system” 2022r.
9. Pani Emilii Czubaj pt.: „Wpływ leków należących do grupy nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy na metabolizm lipidów w komórkach neuronalnych.” 2023
10. Pani Weroniki Siwek pt.: „Wpływ lipotoksyczności wywołanej kwasem palmitynowym na metabolizm komórek neuronalnych.” 2023
11. Pani Anny Sośnickiej pt.: „Wpływ Pycnogenolu[®] na neurotogenezę w organoidach mózgowych. Badanie potencjalnego efektu terapeutycznego w leczeniu zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi. Praca magisterska w toku
12. Pani Natalii Wichrowskiej pt.: „Wpływ Pycnogenolu[®] na poziom synaptycznego pęcherzykowego transportera amin, receptora adrenergicznego alfa-2B, norepinefryny i jego transportera w organoidach mózgowych. Praca magisterska w toku

Opiekun prac magisterskich:

1. Pani Marianna Kołek pt.: „Wpływ wybranych flawonoidów na aktywność acetylocholinoesterazy. Promotor – prof. Joanna Saluk, Katedra Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki. 2015r.
2. Pani Agaty Sztajnert pt.: „Wpływ wybranych flawonów na aktywność acetylocholinoesterazy.” Promotor – prof. Joanna Saluk, Katedra Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki. 2015r.

Recenzje prac magisterskich:

1. Pani Karoliny Wakulik pt.: „Wpływ nowych pochodnych pirolo[3,4-d]pirydazynonu na neurozapalenie wywołane lipopolisacharydem.” wykonanej w Zakładzie Farmakologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2020r.
2. Pani Magdaleny Jamróg pt.: „Rola białka Klotho i FGF23 jako markerów w ostrych zespołach wieńcowych.” Wykonanej w Katedrze Analityki Medycznej Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2021r.
3. Pani Katarzyny Potyrak pt.: „Efekt pochodnych pirolo[3,4-d]pirydazynonu w neurozapaleniu indukowanym preinkubacją z lipopolisacharydem lub współhodowlą z komórkami podobnymi do mikrogleju” wykonanej w Zakładzie Farmakologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2021r.
4. Pani Katarzyny Balon pt.: „Linie komórkowe PC12 i THP-1 jako modele komórek neuronalnych i mikrogleju w badaniach neurobiologicznych” wykonanej w Zakładzie Farmakologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2021r.
5. Pani Adrianna Anna Rojek pt.: „Ocena częstości występowania mikroaberracji w genach BRCA1 i BRCA2 u pacjentek z dziedzicznym rakiem piersi i jajnika.” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Genetyki Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2022 r.
6. Pani Anny Cholewińskiej pt.: „Analiza częstości mutacji c.818 G>A w genie TP53 u dzieci z zaćmą” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2023 r.
7. Pani Klaudi Szymanek pt.: „Wpływ ostrego niedokrwienia i reperfuzji na aktywację inflamasomu w nerce przygotowywanej do przeszczepienia” wykonanej w Katedrze Analityki Medycznej Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2023 r.

6.2 Działalność organizacyjna

Członek Komitetu Organizacyjnego Sympozjum Naukowego pt.: „Interdyscyplinarność współczesnej toksykologii” Wrocław, 11.06.2015

Członek Komitetu Organizacyjnego Międzynarodowej Konferencji 3rd Wrocław Scientific Meetings (1-2.03.2019)

Członek Komitetu Organizacyjnego Międzynarodowej Konferencji 4th Wrocław Scientific Meetings (10.10.2020)

6.3 Działalność popularyzatorska

Prowadzenie warsztatów pt.: „Młodzi detektywi na tropie toksycznych zagadek.” dla uczniów szkół podstawowych w ramach XVIII Dolnośląskiego Festiwalu Nauki 2015 „Światło nauki” (2015)

Prowadzenie warsztatów pt.: „Toksykologiczne zagadki ze szkolnej ławki i własnej chatki.” dla uczniów szkół podstawowych w ramach XVIII Dolnośląskiego Festiwalu Nauki 2015 „Światło nauki” (2015)

Prowadzenie warsztatów pt.: „Gdzie ukrywają się toksyny i co nam mogą zrobić?” dla uczniów szkół podstawowych w ramach XXI Dolnośląski Festiwal Nauki (2018)

Prowadzenie warsztatów pt.: „Młodzi detektywi na tropie toksycznych zagadek” w ramach Miasteczka Naukowego XXV Dolnośląskiego Festiwalu Nauki (2023)

7. Inne informacje

Regionalny certyfikat ratownika medycznego w organizacji non-profit „The White Cross”, jednego ze stowarzyszeń służb ratowniczych we Włoszech (2010-2011)

W latach 2019-2020 byłam ekspertem oceniającym kandydatów aplikujących w programie im. Iwanowskiej Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej.

W 2021 roku byłam sekretarzem Komisji Doktorskiej Pani mgr. Anny Rorbach-Dolaty (19.07.2021). Rozprawa doktorska nt. „Badania modelowe szlaków ekscytotoksyczności w warunkach zaburzeń metabolizmu węglowodanów”.

W 2022 roku zostałam powołana na członka Międzywydziałowego Zespołu ds. Dobrostanu Zwierząt, przy Centrum Badań Przedklinicznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Od 10.2023 współprowadzący Studenckie Koło Naukowe Toksykologiczne przy Katedrze i Zakładzie Toksykologii Na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

8. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego habilitanta

Mój dorobek naukowy według stanu na dzień 26 września 2023 roku obejmuje:

- 1) 9 prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports
- 2) 7 prac przeglądowych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR
- 3) 9 streszczeń z prezentowanych doniesień na konferencjach naukowych,
- 4) Udział w:
 - a) 4 międzynarodowych projektach badawczych finansowanych z grantów ministerialnych Ministero della Salute, Włochy
 - b) 4 międzynarodowych projektach badawczych finansowanych przez organizacje non profit: Fondazione Cariplo (2), Alzheimer Association, Telethon
 - c) 1 projekcie badawczym finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki
 - d) 1 projekcie finansowanym przez Ministerstwo Edukacji i Nauki
 - e) oraz 5 projektach badawczych finansowanych przez Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
- 5) sumaryczny wskaźnik *Impact Factor* według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 71,191, w tym:
 - za okres przed uzyskaniem stopnia doktora wynosi 5,772
 - za okres po uzyskaniu stopnia doktora wynosi 65,419
- 6) łączna punktacja MEiN wynosi 1332 punktów, w tym:
 - za okres do 2018 r. wynosi 152 punktów,
 - za okres po 2019 r. wynosi 1280 punktów,
- 7) liczba wszystkich cytowań publikacji wynosi: według bazy *Web of Science* – 339
- 8) liczba cytowań (bez autocytowań) wynosi: według bazy *Web of Science* – 335
- 9) Index Hirsha (*h-index*) wynosi: według bazy *Web of Science* – 10



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Dr Adriana Kubis-Kubiak

Wykaz osiągnięć naukowych

Katedra i Zakład Toksykologii

Wydział Farmacji Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

Wrocław 2023

I. WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy
Wszystkie artykuły z cyklu opublikowano po uzyskaniu stopnia doktora

Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Analiza mechanizmów patofizjologicznych leżących u podstaw progresji choroby Alzheimer’a ze szczególnym uwzględnieniem wpływu zaburzeń metabolicznych”

Moim osiągnięciem naukowym, będącym podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego jest cykl 6 powiązanych tematycznie artykułów naukowych (P1-P6), opublikowanych w latach 2019-2023. Sumaryczny Impact Factor przedstawionego cyklu publikacji według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi 31,009 co odpowiada 760 punktom Ministerstwa Edukacji i Nauki. W pięciu pracach przedłożonego cyklu jestem pierwszym autorem zaś w jednej drugim.

1. Kubis-Kubiak A., Rorbach-Dolata A., Piwowar A. (2019) Crucial players in Alzheimer's disease and diabetes mellitus: friends or foes? Mech. Ageing Dev. 181:7-21. DOI: 10.1016/j.mad.2019.03.008 IF: 4,304 Pkt. MEiN: 100

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współdziałaniu w koncepcji pracy, opracowaniu konspektu artykułu, przeprowadzeniu systematycznego przeglądu piśmiennictwa, analizie literatury, napisaniu manuskryptu artykułu oraz jego korekcie edytorskiej, opracowaniu części graficznej, złożeniu manuskryptu do czasopisma i kontakcie z redakcją czasopisma.

2. Kubis-Kubiak A., Dyba A., Piwowar A. (2020) The interplay between diabetes and Alzheimer's disease - in the hunt for biomarkers. Int. J. Mol. Sci. 21;8:2744. DOI: 10.3390/ijms21082744 IF: 5,923 Pkt MEiN: 140

Mój indywidualny wkład w powstanie tej publikacji przeglądowej polegał na: propozycji tematyki publikacji, przeglądzie najnowszego piśmiennictwa, analizie danych z piśmiennictwa, przygotowaniu manuskryptu pracy oraz opracowaniu piśmiennictwa, ostatecznej edycji oraz akceptacji końcowej wersji manuskryptu. Jako autor korespondencyjny na złożeniu manuskryptu do czasopisma i kontakcie z redakcją czasopisma oraz z zespołem badawczym przy edycji manuskryptu oraz sformułowaniu odpowiedzi dla recenzentów.

Publikacja została przygotowana w ramach projektu finansowanego ze środków przyznanych przez Ministerstwo Sprawiedliwości Nauki i Szkolnictwa Wyższego w programie "Regionalna Inicjatywa Doskonałości" na lata 2019-2022, projekt numer 016/RID/2018/2019

3. Wiatrak, B., **Kubis-Kubiak, A.**, Piwowar, A., Barg, E. (2020). PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells*, 9(4), 958. DOI: 10.3390/cells9040958 IF:6.600 Pkt. MEiN: 140

Mój indywidualny wkład w powstanie tej oryginalnej pracy polegał na: współdziałaniu w zdefiniowaniu problemu badawczego, ustaleniu metod, technik i narzędzi badawczych, administrowaniu projektem badawczym a także zarządzaniu danymi, prowadzeniu hodowli linii komórkowej PC12, różnicowaniu linii komórkowej PC12 za pomocą różnych rodzajów i stężeń neuronalnego czynnika wzrostu, wykonaniu barwień immunocytochemicznych Doublecortyną i Anti-NeuN, napisaniu wstępu oraz dyskusji z przeprowadzonych eksperymentów, edycji manuskryptu i sformułowaniu odpowiedzi dla recenzentów.

4. Kubis-Kubiak A, Wiatrak B, Piwowar A. (2021) The Impact of High Glucose or Insulin Exposure on S100B Protein Levels, Oxidative and Nitrosative Stress and DNA Damage in Neuron-Like Cells. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(11):5526. DOI: 10.3390/ijms22115526 IF:6.208 Pkt. MEiN: 140

Mój indywidualny wkład w powstanie tej oryginalnej pracy polegał na: zdefiniowaniu problemu badawczego, ustaleniu metod, technik i narzędzi badawczych, administrowaniu projektem badawczym a także zarządzaniu danymi, wykonaniu doświadczeń na liniach komórkowych: różnicowaniu linii komórkowej PC12 za pomocą neuronalnego czynnika wzrostu (NGF), oznaczaniu poziomu markerów stresu oksydacyjnego, oznaczaniu oraz analiza poziomu zewnątrz i wewnątrz komórkowego białka S100B, oznaczaniu oraz analizie uszkodzenia dwuniciowego DNA testem FHA, napisaniu wstępu, metodyki, wyników oraz dyskusji z przeprowadzonych eksperymentów. Jako autor korespondencyjny na złożeniu manuskryptu do czasopisma i kontaktu z redakcją czasopisma oraz z zespołem badawczym przy edycji manuskryptu.

5. Kubis-Kubiak A., Wiatrak B., Piwowar A. (2022) Hyper-glycaemia or insulinemia modulates S100B, S100A8, amyloid β 1-40 and 1-42 secretion and induce morphological changes in dopaminergic neurons. *Biomed. Pharmacother.* 156:113869. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113869 IF: 7.419 Pkt MEiN: 100

Mój indywidualny wkład w powstanie tej oryginalnej pracy polegał na: zdefiniowaniu problemu badawczego, ustaleniu metod, technik i narzędzi badawczych, administrowaniu projektem badawczym a także zarządzaniu danymi, prowadzeniu hodowli komórkowej, różnicowaniu linii SH-SY5Y oraz ustaleniu warunków hiper-glycemii i insulinemii, oznaczaniu poziomu markerów stresu oksydacyjnego, oznaczaniu poziomu białek: S100B, S100A8, Aβ40 oraz Aβ42, wykonaniu barwień DAPI oraz immunocytochemicznych: S100B, MAP2, Doublecortyną i NeuN, napisaniu wstępu, metodyki i wyników z przeprowadzonych eksperymentów oraz dyskusji. Jako autor korespondencyjny na złożeniu manuskryptu do czasopisma i kontaktu z redakcją czasopisma oraz z zespołem badawczym przy edycji manuskryptu.

6. Kubis-Kubiak A., Wiatrak B., Piwowar A. (2023) Comparison of physiological state and conditions imitating comorbidity of type 2 diabetes with Alzheimer's disease. Impact on proliferation, H₂O₂, S100A8, S100B levels, neuronal protrusion and neurogenesis. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research 2023;80(4) DOI (not registered): 10.32383/appdr/171296 (przyjęta do druku) IF: 0.555 Pkt MEiN: 140

Mój indywidualny wkład w powstanie tej oryginalnej pracy polegał na: zdefiniowaniu problemu badawczego, ustaleniu metod, technik i narzędzi badawczych, administrowaniu projektem badawczym a także zarządzaniu danymi, prowadzeniu hodowli komórkowej, różnicowaniu linii SH-SY5Y oraz oznaczaniu poziomu H₂O₂, S100B, S100A8 oraz Aβ42, wykonaniu barwień immunocytochemicznych, napisaniu wstępu, metodyki i wyników z przeprowadzonych eksperymentów oraz dyskusji. Jako autor korespondencyjny na złożeniu manuskryptu do czasopisma i kontaktu z redakcją czasopisma oraz z zespołem badawczym przy edycji manuskryptu.

Mój udział procentowy w powstanie każdego z artykułów stanowiących osiągnięcie naukowe szacuję na przynajmniej 80%.

Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego z nich w ich powstanie.

II. WYKAZ AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ

1. Wykaz opublikowanych monografii naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.1).

Nie dotyczy

2. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych

Nie dotyczy

3. Wykaz członkostwa w redakcjach naukowych monografii.

Nie dotyczy

4. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.2).

Przed doktoratem:

1. **Kubis A.** (2000). Proteolytic enzymes as medications in therapy of cardiac infarction. Świat Farmacji, 1;27-28 **Pkt MEiN:6**
2. **Kubis A.**, Marcinkowska E., Janusz M., Lisowski J. (2005) Studies on the mechanism of action of a proline-rich polypeptide complex (PRP): Effect on the stage of cell differentiation. Peptides 26;11, p:2188-2192
3. **Kubis, A.M.** Janusz, M. (2008) Choroba Alzheimerera - nowe możliwości terapeutyczne oraz stosowane modele eksperymentalne [Alzheimer's disease: new prospects in therapy and applied experimental models]. Postepy Hig i Med Dośw. (online) 62;372-392 **IF:0.863 Pkt. MEiN:9**
4. Janusz M., Woszczyzna M., Lisowski M., **Kubis A.**, Macała J., Gotszalk T., Lisowski J. (2009) Ovine colostrum nanopeptide affects amyloid beta aggregation. FEBS Letters 583;1, p: 190-196, **IF: 3.870 MEiN:32**

Po doktoracie:

1. **Kubis AM.**, Piwowar A. (2015) The new insight on the regulatory role of the vitamin D3 in metabolic pathways characteristic for cancerogenesis and neurodegenerative diseases. Ageing Res. Rev. 24 part B s.126-137 **IF:7,526 Pkt. MEiN:45**
2. Rorbach-Dolata A., **Kubis A.**, Piwowar A. (2017) Modyfikacje epigenetyczne - ważny mechanizm w zaburzeniach cukrzycy (Epigenetic modifications: An important mechanism in diabetic disturbances). Post. Hig. Med. Dośw. 71:960-974 **IF:0,783 Pkt MEiN:15**
3. Di Fede G., Catania M., Maderma E., Ghidoni R., Benussi L., Tonoli E., Giaccone G., Moda F., Paterlini A., Campagniani I., Sorrentino S., Colombo L., **Kubis A.**, Bistaffa E., Ghetti B., Tagliavini F. (2018) Molecular subtypes of Alzheimer's disease. Sci. Rep. 8;3269 **IF:4,011 Pkt. MEiN:40**
4. **Kubis-Kubiak A.**, Rorbach-Dolata A., Piwowar A. (2019) Crucial players in Alzheimer's disease and diabetes mellitus: friends or foes? Mech. Ageing Dev. 181:7-21 **IF:4,304 Pkt. MEiN:100**

5. Wiatrak B. **Kubis-Kubiak A.**, Piwwoar A., Barg E. (2020) PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions. Cells 9;4:958, doi:10.3390/cells9040958 **IF:6,6 Pkt. MEiN:140**
6. **Kubis-Kubiak A.**, Dyba A., Piwowar A. (2020) The interplay between diabetes and Alzheimer's disease - in the hunt for biomarkers. Int. J. Mol. Sci. 21;8:2744 **IF:5,923 Pkt. MEiN:140**
7. Kratz EM., Sołkiewicz K., **Kubis-Kubiak A.**, Piwowar A. (2021) Sirtuins as important factors in pathological states and the role of their molecular activity modulators. Int. J. Mol. Sci. 22;2:630 **IF:5,923 Pkt. MEiN:140**
8. **Kubis-Kubiak A.**, Wiatrak B. Piwowar A. (2021) The impact of high glucose or insulin exposure on S100B protein levels, oxidative and nitrosative stress and DNA damage in neuron-like cells. Int. J. Mol. Sci. 22;11:5526 **IF: 5,923 Pkt. MEiN:140**
9. Wiatrak B., Jawień P., Matuszewska A., Szelağ A., **Kubis-Kubiak A.** (2022) Effect of amyloid- β on the redox system activity in SH-SY5Y cells preincubated with lipopolysaccharide or co-cultured with microglia cells. Biomed. Pharmacother. 149;112880 **IF:7.419 Pkt. MEiN: 100**
10. Lipke K., **Kubis-Kubiak A.**, Piwowar A. (2022) Molecular mechanism of lipotoxicity as an interesting aspect in the development of pathological states - current view of knowledge. Cells 11;5:844 **IF: 7.666 Pkt. MEiN: 140**
11. Fortuna W., Wiatrak B., Jawień P., **Kubis-Kubiak A.**, Li Y., Li D., Tabakow P. (2022) Three-dimensional collagen scaffolds in cultures of olfactory ensheathing cells used for severed spinal cord regeneration. In Vivo **IF:2.155 Pkt MEiN:40**
12. **Kubis-Kubiak A.**, Wiatrak B., Piwowar A. (2022) Hyperglycaemia or insulinemia modulates oxidative stress, S100B, S100A8, amyloid β 1-40 and 1-42 secretion and induce morphological changes in dopaminergic neurons. Biomed. Pharmacother. 156:113869 **IF:7.419 Pkt. MEiN: 100**
13. **Kubis-Kubiak A.**, Wiatrak B., Piwowar A. (2023) Comparison of physiological state and conditions imitating comorbidity of type 2 diabetes with Alzheimer's disease. Impact on proliferation, H₂O₂, S100A8, S100B levels, neuronal protrusion and neurogenesis. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research 2023;80(4) DOI (not registered): 10.32383/appdr/171296 (przyjęta do druku) **IF:5.5 Pkt. MEiN: 140**
14. Lipke K., **Kubis-Kubiak A.**, Piwowar A (2023) The influence of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on microglial activity, lipid content and fatty-acid-binding proteins levels. Advances in Medical Science IF: 2.852 Pkt. MEiN 140 (w recenzji)

15. Sośnicka, A., Piwowar A., **Kubis-Kubiak A.** Effect of Pycnogenol® on neuritogenesis and synaptic transport in brain organoids. Investigation of the potential therapeutic effect in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. (w przygotowaniu)
16. **Kubis-Kubiak A.**, Wiatrak B., Piwowar A. Development and optimization of a quick, simple and effective method for the isolation and cultivation of neuronal and astrocytic cells obtained from frozen animal material. (w przygotowaniu)

5. Wykaz osiągnięć projektowych, konstrukcyjnych, technologicznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3).

Nie dotyczy

6. Wykaz publicznych realizacji dzieł artystycznych (z zaznaczeniem pozycji niewymienionych w pkt I.3).

Nie dotyczy

7. Wykaz wystąpień na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

Przed doktoratem:

1. **Kubis A.**, Janusz M. (2007) Studies on mechanism of action of proline-rich polypeptide (PRP) – effect on cytokine induction. Poster presentation on 8th International AD/PD Conference, Salzburg, Austria.
2. **Kubis A.**, Marcinkowska E., Janusz M., Lisowski J. (2004) Studies on mechanism of action of proline-rich polypeptide (PRP) – effect on phagocytosis. Poster presentation on 29th Meeting of Federation of European Biochemical Societies, Warsaw, Poland

Po doktoracie:

1. Dyba A., **Kubis-Kubiak A.**, Piwowar A. (2019) Analogies in pathogenesis of Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. W:3rd Wroclaw Scientific Meetings. Wrocław, 1-2.03.2019 ; Wrocław : Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s.67 poz. P13
2. **Kubis-Kubiak A.**, Piwowar A. (2019) Comorbidity of diabetes with neurodegenerative diseases. In vitro study of the influence of hyper- glycaemia and -insulinaemia on the metabolism of S100B protein - a potential marker for Alzheimer's disease development. The

- Brain Conferences "Understanding and targeting Alzheimer's disease". Rungstedgaard, Denmark, 5-8.05.2019; s.43
3. **Kubis-Kubiak A.**, Di Fede G., Piwowar A. (2018) Relations between pleomorphic A β assemblies and distinct AD phenotypes. Abstracts presented at the Workshop on Integrative Approaches in Neurodegeneration. Lisboa, Portugal, s.49 poz. P12
 4. Matera-Witkiewicz A., **Kubis-Kubiak A.**, Laskowski M., Fecka I., Kozera Ł., Piwowar A. (2018) Wroclaw Medical University Biobank: biosharing of biological samples for scientific purposes. Towards comprehensive population studies - Bialystok PLUS. Białystok, 13-14.04.2018; s.23-24
 5. Rorbach-Dolata A., **Kubis A.**, Oleksy M., Piwowar A. (2015) Neuronal glucotoxicity of human brain. The 10th International Conference of Young Naturalists "From biotechnology to environmental protection" - The Interdisciplinary Meeting of Young Naturalists. Zielona Góra, Poland, 12-15.11.2015; Zielona Góra : The Biologist Scientific Union of University of Zielona Góra, 2015; s.84 ISBN 978-83-943745-0-1
 6. Rorbach-Dolata A., **Kubis A.**, Piwowar A. (2015) Cancer vs. Neurodegeneration - inverse comorbidity association. W:Puzzle 2015 - IV Wrocławska Konferencja Studentów Nauk Technicznych i Ścisłych. Wrocław, 18-19.04.2015; s.181
 7. Di Fede G., Ghidoni R., CataniaM., Giaccone G., Benussi L., Moda F., Gobbi M., Moro M., **Kubis A.**, RuggeroneM., Ghetti B., Binetti G., Salmona M., Tagliavini F (2012). Phenotypic heterogeneity of Alzheimer's disease: towards the identification of molecular determinants underlying distinct clinico-pathological subgroups. Plakat na Konferencji AICAD 2012
 8. Di Fede G., CataniaM., Giaccone G., Ghidoni R., Albertini V., Moda F., **Kubis A.**, Moro M., Ruggerone M., Tagliavini F. (2012) Phenotypic heterogeneity of Alzheimer's disease: towards the identification of molecular determinants underlying distinct clinico-pathological subgroups. Plakat na XLIII Congresso Nazionale di Societa Italiana di Neurologia, SINDem Rimini, Italia 6-9.10.2012
 9. Diomedede L., Salmona M., Catania M., Romeo M., Stravalaci M., Moda F., **Kubis A.**, Tagliavini F., DiFede G. (2011) Bad gene, good gene: recessive APP mutation can be both. Plakat na spotkaniu Theleton 2011
 8. Wykaz udziału w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.

Pod doktoracie:

1. Członek Komitetu Organizacyjnego Sympozjum Naukowego pt.: „Interdyscyplinarność współczesnej toksykologii” Wrocław, 11.06.2015
2. Członek Komitetu Organizacyjnego Międzynarodowej Konferencji 3rd Wrocław Scientific Meetings (1-2.03.2019)
3. Członek Komitetu Organizacyjnego Międzynarodowej Konferencji 4th Wrocław Scientific Meetings (10.10.2020)
4. Wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

Przed doktoratem:

1. Członek zespołu badawczego trzyletniego grantu pt.: „Badania nad mechanizmem działania PRP/Colostrininy – preparatu wykazującego terapeutyczne efekty w chorobie Alzheimer’a.” (Nr. 4PO5A01518) Komitetu Badań Naukowych MEiN, grant doktorancki (2003–2007)

Po doktoracie:

1. Członek zespołu badawczego projektu pt.: "Marker biologici di neurodegenerazione"- RF92-CONV.71,6 MS S LUCIA, (01.10.2008 – 31.03.2009)
2. Członek zespołu badawczego projektu pt.: "Fattori di rischio genetico e indicatori biologici periferici di conversione da mild cognitive impairment a malattia di Alzheimer – RF 112 MS Strategico (01.01.2010 – 31.12.2010)
3. Członek zespołu badawczego projektu pt.: „Mechanism of neurodegeneration and phenotypic heterogeneity in inherited prion diseases: pathophysiological involvement of prion proteins in membrane trafficking and signaling” RA57 (01.07.2011-31.12.2011)
4. Członek zespołu badawczego projektu pt.: "Development of Alzheimer disease therapeutics based on natural variant of Amyloid-beta that hinders amyloidogenesis.” – RF 136 (01.01.2013-11.04.2013)

5. Członek zespołu badawczego projektu naukowego pt.: „Wpływ interakcji estrogenów z metaloestrogenem na komórki gruczołu sutkowego.” realizowany w ramach środków przyznanych przez Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu. Nr. wewnętrzny simple: ST.D150.18.004 (01.10.2018 - 30.09.2019)
6. Wykonawca zadania w projekcie pn. „Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu jako Regionalny Ośrodek Doskonałości w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu” realizowanym w ramach środków przyznanych przez Ministerstwo Edukacji Nauki w programie „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” (RID) – nr umowy 016/RID/2018/19. Projekt ma przyczynić się do rozwoju badań naukowych i prac rozwojowych na Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu. Projekt numer 016/RID/2018/2019
7. Członek zespołu badawczego projektu naukowego pt.: „Ocena zmian ekspresji wybranych białek z rodziny uroplakin (II i IIIa) w wybranych nienowotworowych chorobach urologicznych.” realizowany w ramach środków przyznanych przez Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu. Nr. wewnętrzny simple: SUB.D150.21.097 (01.10.2020-30.09.2022)
8. Członek zespołu badawczego projektu naukowego pt.: „Ocena udziału wybranych ksenobiotyków w zaburzeniach równowagi redox u osób narażonych środowiskowo.” realizowany w ramach środków przyznanych przez Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu. Nr. wewnętrzny simple: SUBZ.D150.22.043 (1.01.2022 -31.12.2022)
9. Członek zespołu badawczego projektu pt.: „Analiza procesów neurozapalnych i demielinizacyjnych w badaniach in vitro oraz in vivo. grant badawczy przyznany przez Wrocławski Uniwersytet Medyczny, Nr. wewnętrzny simple: SUBK.D150.22.027 (1.01.2022 - 31.12.2022)
10. Kierownik projektu pt.: „Wpływ leków z grupy odwrotnej inhibitorów odwrotnej transkryptazy na homeostazę lipidów jako potencjalnych induktorów lipotoksyczności w komórkach nerwowych.” Grant badawczy przyznany przez Wrocławski Uniwersytet Medyczny. Nr. wewnętrzny simple: SUBK.D150.22.038 (1.01.2022 - 31.12.2022) projekt w toku.
11. Kierownik grantu Miniatura 6 pt.: „Modelowanie zaburzeń neuropatologicznych w naczyniu – generowanie i charakteryzowanie organoidów mózgu oraz asembloidów o różnych tożsamościach regionalnych” finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki. Nr. wewnętrzny simple: MINI.D150.22.002 (1.10.2022 - 30.09.2023) projekt w toku
5. Wykaz członkostwa w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

6. Wykaz staży w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.

Po doktoracie:

1. 01.10.2008-15.04.2013r. Staż badawczy Post-Doc w Laboratorium Neuropatologii V, I.R.C.C.S. National Neurological Institute "Carlo Besta", Mediolan, Włochy. Prowadziłam badania przedkliniczne nad nowymi strategiami terapeutycznymi w chorobie Alzheimerera. Charakteryzowałam właściwości biochemiczne mutacji A673V APP. Wykonywałam również testy diagnostyczne w kierunku choroby Creutzfeld'a-Jacob'a,
 2. 28.02-10.03.2020r. Staż naukowy w Center for Alternatives to Animal Testing, John Hopkins University, Baltimore, MD, USA Szkolenie w zakresie rozwoju i hodowli kokultur organotypowych 3D takich jak: BrainSphere i LUHMES. Szkolenie z zakresu neurotoksyczności - ekspresja genów związanych ze stresem oksydacyjnym i specyficznych dla OUN, analiza uwalniania chemokin, cytokin i czynników wzrostu, ocena mielinizacji i zmian morfologicznych w neuronach. Profilowanie transkryptomu i analiza proteomiczna.
 3. 19.06.2023-07.07.2023r. Staż badawczy w Laboratorium Biomodel Platform for Human Research w „Achucarro” Basque Center for Neuroscience Research, Bilbao, Hiszpania. Zapoznawałam z technikami hodowli ludzkich organoidów mózgowych. Przeprowadziłam też badania na ludzkich organoidach mózgowych sprawdzające hipotezę potencjalnego działania terapeutycznego ekstraktu z kory francuskiej sosny nadmorskiej (*Pinus Pinaster*, Pycnogenol®) w leczeniu zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi.
7. Wykaz członkostwa w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.).

Nie dotyczy

8. Wykaz recenzowanych prac naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych

Po doktoracie zrecenzowałam ponad 10 prac naukowych złożonych do publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym: *Advances in Clinical and Experimental Medicine* (IF:2.1), *Acta Biochimica Polonica* (IF:2.349), *Acta Neurobiologiae Experimentalis* (IF:1.269), *Amyloides* (IF:5.5), *Aging Cell* (IF:7.8), *Neurochemical Research* (IF:4.414).

Recenzje prac magisterskich:

1. Pani Karoliny Wakulik pt.: „Wpływ nowych pochodnych pirolo[3,4-d] pirydazynonu na neurozapalenie wywołane lipopolisacharydem.” wykonanej w Zakładzie Farmakologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2020r.
 2. Pani Magdaleny Jamróg pt.: „Rola białka Klotho i FGF23 jako markerów w ostrych zespołach wieńcowych.” Wykonanej w Katedrze Analityki Medycznej Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2021r.
 3. Pani Katarzyny Potyrak pt.: „Efekt pochodnych pirolo[3,4-d]pirydazynonu w neurozapaleniu indukowanym preinkubacją z lipopolisacharydem lub współhodowlą z komórkami podobnymi do mikrogleju” wykonanej w Zakładzie Farmakologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2021r.
 4. Pani Katarzyny Balon pt.: „Linie komórkowe PC12 i THP-1 jako modele komórek neuronalnych i mikrogleju w badaniach neurobiologicznych” wykonanej w Zakładzie Farmakologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2021r.
 5. Pani Adrianna Anna Rojek pt.: „Ocena częstości występowania mikroaberracji w genach BRCA1 i BRCA2 u pacjentek z dziedzicznym rakiem piersi i jajnika.” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Genetyki Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2022 r.
 6. Pani Anny Cholewińskiej pt.: „Analiza częstości mutacji c.818 G>A w genie TP53 u dzieci z zaćmą” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Biologii Molekularnej i Komórkowej Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2023 r.
 7. Pani Klaudi Szymanek pt.: Wpływ ostrego niedokrwienia i reperfuzji na aktywację inflamasomu w nerce przygotowywanej do przeszczepienia” wykonanej w Katedrze Analityki Medycznej Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. 2023 r.
9. Wykaz uczestnictwa w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.
1. Członek zespołu badawczego projektu pt.: „Genoproteomics of age related disorders” - RA3 Cariplo-Nobel (01.04.2009 -31.12.2009)
 2. Członek zespołu badawczego projektu pt.: „Novel therapeutic strategies for Alzheimer’s disease and other amyloidoses.: analysis of their efficacy in transgenic C. elegans expressing human proteins.” – RA53 Cariplo-Nobel (01.01.2011-30.06.2011)

3. Członek zespołu badawczego projektu pt.: "Trans-suppression of Abeta amyloidogenesis in cellular and nematode models." – Grant Alzheimer Association (01.01.2012-31.02.2012)
4. Członek zespołu badawczego projektu pt.: "Bad gene, good gene: a recessive APP mutation can be both." – RT 16, Telethon, (01.04.2012-31.12.2012)

4. Wykaz udziału w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt. II.9.

Nie dotyczy

5. Wykaz uczestnictwa w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny.

Pod doktoracie:

W latach 2019-2020 byłam ekspertem oceniającym kandydatów aplikujących w programie im. Iwanowskiej Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej.

III. WSPÓŁPRA Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM

1. Wykaz dorobku technologicznego.

Nie dotyczy

2. Współpraca z sektorem gospodarczym.

Nie dotyczy

3. Wykaz uzyskanych praw własności przemysłowej, w tym uzyskanych patentów krajowych lub międzynarodowych.

Nie dotyczy

4. Wykaz wdrożonych technologii.

Nie dotyczy

5. Wykaz wykonanych ekspertyz lub innych opracowań wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców.

Po doktoracie:

Firma Hasco Lek poprosiła mnie o stworzenie planu eksperymentów przewidzianych do realizacji w ramach badań zamawianych pt.: "Test transformacji komórkowej pod wpływem leku Urosal oraz jego aktywnych składników". Według wytycznych uzyskanych z firmy stworzyłam

projekt badawczy zakładający użycie testu in vitro transformacji komórkowej Bhas 42 CTA według protokołu DB-ALM Protocol n°156.

6. Wykaz udziału w zespołach eksperckich lub konkursowych.

Nie dotyczy

7. Wykaz projektów artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi.

Nie dotyczy

IV. DANE NAUKOMETRYCZNE

1. Impact Factor: 71,191

Punktacje za publikacje

	Liczba punktów		Impact factor (liczba prac)	
	całość	bez cyklu	całość	bez cyklu
A. Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora	52,0	52,0	5,772 (2)	5,772 (2)
B. Publikacje po uzyskaniu stopnia doktora	1280,0	520,0	65,419 (12)	34,328 (7)
RAZEM:	1332,0	572,0	71,191 (14)	40,1 (9)

2. LICZBA CYTOWAŃ: ogółem: 339; bez autocytowań: 335 (wg Web of Science Core Collection z dnia 26.09. 2023 r.)

3. Indeks Hirscha. h-index = 10 (wg Web of Science Core Collection z dnia 26.09.2023 r.)

4. Informacja o liczbie punktów MEiN

Przed uzyskaniem stopnia doktora: 52

Po uzyskaniu stopnia doktora: 1280

.....

(podpis wnioskodawcy)



PODPIS ZAUFANY

ADRIANA MARIA
KUBIS-KUBIAK

27.09.2023 15:57:32 (GMT+2)

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Wrocław, dn . 20.09.2023 r.

Dr Adriana Kubis-Kubiak

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych

„Analiza mechanizmów patofizjologicznych leżących u podstaw progresji choroby Alzheimer'a
ze szczególnym uwzględnieniem wpływu zaburzeń metabolicznych.”

Lp.	Opis bibliograficzny	IF	Punkty
1.	Kubis-Kubiak Adriana M. , Rorbach-Dolata Anna, Piwowar Agnieszka: Crucial players in Alzheimer's disease and diabetes mellitus: friends or foes?, Mechanisms of Ageing and Development, 2019, vol. 181, s. 7-21, DOI:10.1016/j.mad.2019.03.008	4,304	100
2.	Wiatrak Benita, Kubis-Kubiak Adriana , Piwowar Agnieszka, Barg Ewa: PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions, Cells, 2020, vol. 9, nr 4, art.958 [15 s.], DOI:10.3390/cells9040958	6,6	140
3.	Kubis-Kubiak Adriana , Dyba Aleksandra, Piwowar Agnieszka: The interplay between diabetes and Alzheimer's disease - in the hunt for biomarkers, International Journal of Molecular Sciences, 2020, vol. 21, nr 8, art.2744 [22 s.], DOI:10.3390/ijms21082744	5,924	140
4.	Kubis-Kubiak Adriana , Wiatrak Benita, Piwowar Agnieszka: The impact of high glucose or insulin exposure on S100B protein levels, oxidative and nitrosative stress and DNA damage in neuron-like cells, International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 11, art.5526 [17 s.], DOI:10.3390/ijms22115526	6,208	140
5.	Kubis-Kubiak Adriana , Wiatrak Benita, Piwowar Agnieszka: Hyper-glycemia and insulinemia induce morphological changes and modulate secretion of S100B, S100A8, amyloid β 1-40 and amyloid β 1-42, in a model of human dopaminergic neurons, Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, vol. 156, art.113869 [16 s.], DOI:10.1016/j.biopha.2022.113869	7,5	100

Łączny impact factor : 30,536

Punkty ministerialne : 620,0

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Biblioteka Główna
DZIAŁ BIBLIOGRAFII I BIBLIOMETRII
ul. Marcinkowskiego 2-6, 50-368 Wrocław
tel. 71 784 19 25

20.09.2023r. Beata Chajewska
(data i podpis osoby sporządzającej punktację)

Wykaz opublikowanych prac naukowych

Rozprawa doktorska

Adriana Maria Kubis-Kubiak, Uniwersytet Wrocławski : *Regulatorowe właściwości colostriny i jej składowego nonapeptydu wobec linii komórkowych i peptydu Aβ42*. Wrocław, 2008 ; 152 s.

A. PRACE WYKONANE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA

I. Wykaz opublikowanych monografii naukowych -

II. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych - (w tym w recenzowanych monografiach z konferencji)

III. Informacja o członkostwie w redakcjach naukowych monografii -

IV. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych

1. **Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe** (bez streszczeń zjazdowych i konferencyjnych, prac w suplementach czasopism, listów do redakcji oraz udziału autora wymienionego w dodatku (appendix) jako uczestnika badań wielośrodkowych)

1.1. w czasopismach posiadających „impact factor”

Lp.	Opis bibliograficzny	IF	Punkty
1	Kubis Adriana , Marcinkowska Ewa, Janusz Maria, Lisowski Józef: Studies on the mechanism of action of a proline-rich polypeptide complex (PRP): effect on the stage of cell differentiation, <i>Peptides</i> , 2005, vol. 26, nr 11, s. 2188-2192, DOI:10.1016/j.peptides.2005.04.001	2,231	11
2	Janusz Maria, Woszczyna Mirosław, Lisowski Marek, Kubis Adriana , Macała Józefa, Gotszalk Teodor, Lisowski Józef: Ovine colostrum nanopptide affects amyloid beta aggregation, <i>FEBS Letters</i> , 2009, vol. 583, nr 1, s. 190-196, DOI:10.1016/j.febslet.2008.11.053	3,541	32

1.2. w czasopismach bez „impact factor” -

2. Opisy przypadków –

3. Prace pogładowe

3.1. w czasopismach posiadających „impact factor”-

3.2. w czasopismach bez „impact factor”

Lp	Opis bibliograficzny	Punkty
1	Kubis Adriana M. , Janusz Maria: Choroba Alzheimer - nowe możliwości terapeutyczne oraz stosowane modele eksperymentalne, <i>Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej</i> , 2008, vol. 62, s. 372-392	9

4. Publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism -

5. Listy naukowe do redakcji -

6. Publikacje z udziałem autora w badaniach wielośrodkowych w czasopismach (kontrybutorskie) –

B. PRACE WYKONANE PO UZYSKANIU STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA

I. Wykaz opublikowanych monografii naukowych -

II. Wykaz opublikowanych rozdziałów w monografiach naukowych - (w tym w recenzowanych monografiach z konferencji)

III. Informacja o członkostwie w redakcjach naukowych monografii -

IV. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych

1. Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe (bez streszczeń zjazdowych i konferencyjnych, prac w suplementach czasopism, listów do redakcji oraz udziału autora wymienionego w dodatku (appendix) jako uczestnika badań wielośrodkowych)

1.1. w czasopismach posiadających „impact factor”

Lp.	Opis bibliograficzny	IF	Punkty
1	Di Fede Giuseppe, Catania Marcella, Maderna Emanuela, Ghidoni Roberta, Benussi Luisa, Tonoli Elisa, Giaccone Giorgio, Moda Fabio, Paterlini Anna, Campagnani Ilaria, Sorrentino Stefano, Colombo Laura, Kubis Adriana , Bistaffa Edoardo, Ghetti Bernardino, Tagliavini Fabrizio: Molecular subtypes of Alzheimer's disease, Scientific Reports, 2018, vol. 8, art.3269 [14 s.], DOI:10.1038/s41598-018-21641-1	4,011	40
2	Wiatrak Benita, Kubis-Kubiak Adriana , Piwowar Agnieszka, Barg Ewa: PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions, Cells, 2020, vol. 9, nr 4, art.958 [15 s.], DOI:10.3390/cells9040958	6,6	140
3	Kubis-Kubiak Adriana , Wiatrak Benita, Piwowar Agnieszka: The impact of high glucose or insulin exposure on S100B protein levels, oxidative and nitrosative stress and DNA damage in neuron-like cells, International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 11, art.5526 [17 s.], DOI:10.3390/ijms22115526	6,208	140
4	Wiatrak Benita, Jawień Paulina, Matuszewska Agnieszka, Szelaż Adam, Kubis-Kubiak Adriana : Effect of amyloid- β on the redox system activity in SH-SY5Y cells preincubated with lipopolysaccharide or co-cultured with microglia cells, Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, vol. 149, art.112880 [14 s.], DOI:10.1016/j.biopha.2022.112880	7,5	100
5	Kubis-Kubiak Adriana , Wiatrak Benita, Piwowar Agnieszka: Hyper-glycemia and insulinemia induce morphological changes and modulate secretion of S100B, S100A8, amyloid β 1-40 and amyloid β 1-42, in a model of human dopaminergic neurons, Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, vol. 156, art.113869 [16 s.], DOI:10.1016/j.biopha.2022.113869	7,5	100
6	Fortuna Wojciech, Wiatrak Benita, Jawień Paulina, Kubis-Kubiak Adriana , Li Ying, Li Daqing, Tabakow Paweł: Three-dimensional collagen scaffolds in cultures of olfactory ensheathing cells used for severed spinal cord regeneration, In Vivo, 2022, vol. 36, nr 5, s. 2032-2041, DOI:10.21873/invivo.12929	2,3	40

1.2. w czasopismach bez „impact factor” -

2. Opisy przypadków -

3. Prace poglądowe

3.1. w czasopismach posiadających „impact factor”

Lp.	Opis bibliograficzny	IF	Punkty
1	Kubis Adriana Maria , Piwowar Agnieszka: The new insight on the regulatory role of the vitamin D3 in metabolic pathways characteristic for cancerogenesis and neurodegenerative diseases, Ageing Research Reviews, 2015, vol. 24, s. 126-137, DOI:10.1016/j.arr.2015.07.008	7,526	45
2	Rorbach-Dolata Anna, Kubis Adriana , Piwowar Agnieszka: Modyfikacje epigenetyczne - ważny mechanizm w zaburzeniach cukrzycy, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2017, vol. 71, s. 960-974, DOI:10.5604/01.3001.0010.6156	0,783	15
3	Kubis-Kubiak Adriana M. , Rorbach-Dolata Anna, Piwowar Agnieszka: Crucial players in Alzheimer's disease and diabetes mellitus: friends or foes?, Mechanisms of Ageing and Development, 2019, vol. 181, s. 7-21, DOI:10.1016/j.mad.2019.03.008	4,304	100
4	Kubis-Kubiak Adriana , Dyba Aleksandra, Piwowar Agnieszka: The interplay between diabetes and Alzheimer's disease - in the hunt for biomarkers, International Journal of Molecular Sciences, 2020, vol. 21, nr 8, art.2744 [22 s.], DOI:10.3390/ijms21082744	5,924	140
5	Kratz Ewa Maria, Sołkiewicz Katarzyna, Kubis-Kubiak Adriana , Piwowar Agnieszka: Sirtuins as important factors in pathological states and the role of their molecular activity modulators, International Journal of Molecular Sciences, 2021, vol. 22, nr 2, art.630 [31 s.], DOI:10.3390/ijms22020630	6,208	140
6	Lipke Katarzyna, Kubis-Kubiak Adriana , Piwowar Agnieszka: Molecular mechanism of lipotoxicity as an interesting aspect in the development of pathological states - current view of knowledge, Cells, 2022, vol. 11, nr 5, art.844 [34 s.], DOI:10.3390/cells11050844	6	140

3.2. w czasopismach bez „impact factor” -

4. Publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism -

5. Listy naukowe do redakcji -

6. Publikacje z udziałem autora w badaniach wielośrodkowych w czasopismach (kontrybutorskie) - (autor wymieniony w dodatku (appendix) jako uczestnik badań wielośrodkowych)

Wrocław, dn. 20.09.2023 r.

Dr Adriana Kubis-Kubiak

Punktacja za publikacje

	Liczba punktów		Impact factor (liczba prac)	
	całość	bez cyklu	całość	bez cyklu
A. Publikacje przed uzyskaniem stopnia doktora	52,0	52,0	5,772 (2)	5,772 (2)
B. Publikacje po uzyskaniu stopnia doktora	1140,0	520,0	64,864 (12)	34,328 (7)
RAZEM:	1192,0	572,0	70,636 (14)	40,1 (9)

LICZBA CYTOWAŃ:

ogółem: 341 ; h-index = 10

bez autocytowań: 337

(wg *Web of Science Core Collection*)

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Biblioteka Główna
DZIAŁ BIBLIOGRAFII I BIBLIOMETRII
ul. Marcinkowskiego 2-6, 50-368 Wrocław
tel. 71 784 19 25

20.09.2023r. Beata Najewska

(data i podpis osoby sporządzającej punktację)

Search > Results for KUBIS ADRIANA ... > Citation Report: Marked List: Unfiled

Citation Report

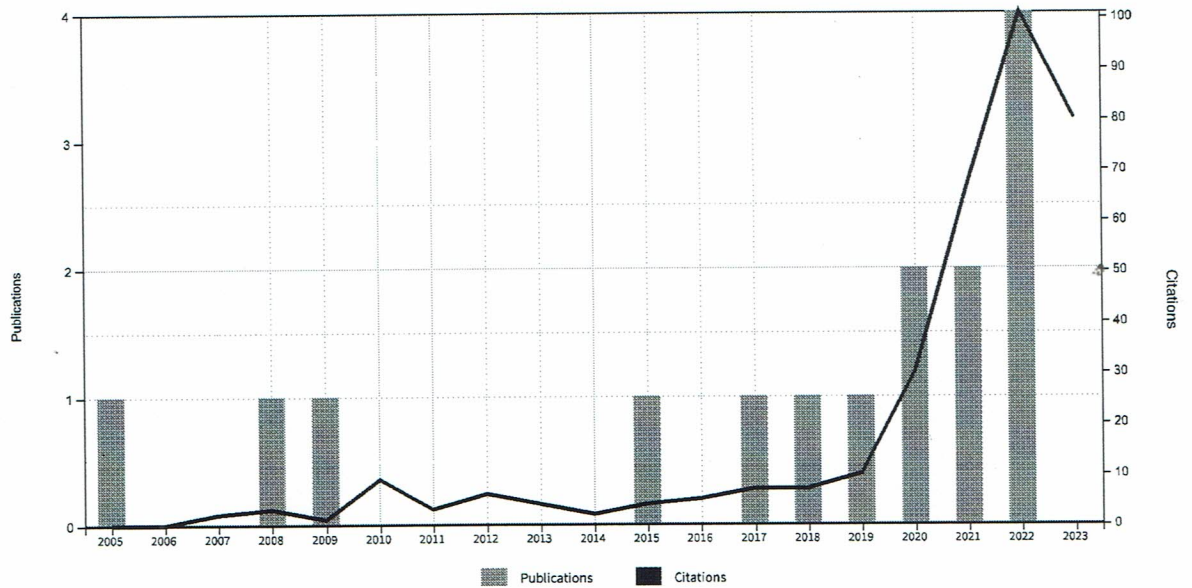
Analyze Results

Export Full Report

<p>Publications</p> <p>15</p> <p>Total</p> <p>From 1900 to 2023</p>	<p>Citing Articles</p> <p>336 Analyze</p> <p>Total</p> <p>332 Analyze</p> <p>Without self-citations</p>	<p>Times Cited</p> <p>341</p> <p>Total</p> <p>337</p> <p>Without self-citations</p>	<p>22.73</p> <p>Average per item</p>	<p>10</p> <p>H-Index</p>
---	--	--	---	---------------------------------

Times Cited and Publications Over Time

DOWNLOAD



<p>15 Publications</p> <p>Sort by: Citations: highest first</p> <p>< 1 of 1 ></p>	Citations						Average per year	Total				
	< Previous year		Next year >			2019			2020	2021	2022	2023
	2019	2020	2021	2022	2023							
Total	10	30	67	101	80	20.06	341					
<p>1</p> <p>PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions</p> <p>Wiatrak, B; Kubis-Kubiak, A; (...); Barg, E</p>	0	3	22	51	44	30	120					

	Apr 2020 CELLS 9 (4)							
⊖ 2	Molecular subtypes of Alzheimer's disease <u>Di Fede, G; Catania, M; (...); Tagliavini, F</u> Feb 19 2018 SCIENTIFIC REPORTS 8	4	13	18	5	5	8.17	49
⊖ 3	Sirtuins as Important Factors in Pathological States and the Role of Their Molecular Activity Modulators <u>Kratz, EM; Solkiewicz, K; (...); Piwowar, A</u> Jan 2021 INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 22 (2)	0	0	8	16	7	10.33	31
⊖ 4	Crucial players in Alzheimer's disease and diabetes mellitus: Friends or foes? <u>Kubis-Kubiak, AM; Rorbach-Dolata, A and Piwowar, A</u> Jul 2019 MECHANISMS OF AGEING AND DEVELOPMENT 181, pp.7-21	1	9	4	7	4	5	25
⊖ 5	Ovine colostrum nanopeptide affects amyloid beta aggregation <u>Janusz, M; Woszczyna, M; (...); Lisowski, J</u> Jan 5 2009 FEBS LETTERS 583 (1), pp.190-196	0	1	3	0	0	1.67	25
⊖ 6	Molecular Mechanism of Lipotoxicity as an Interesting Aspect in the Development of Pathological States-Current View of Knowledge <u>Lipke, K; Kubis-Kubiak, A and Piwowar, A</u> Mar 2022 CELLS 11 (5)	0	0	0	6	16	11	22
⊖ 7	The new insight on the regulatory role of the vitamin D3 in metabolic pathways characteristic for cancerogenesis and neurodegenerative diseases <u>Kubis, AM and Piwowar, A</u> Nov 2015 AGEING RESEARCH REVIEWS 24, pp.126-137	4	0	1	2	0	1.67	15
⊖ 8	The Interplay between Diabetes and Alzheimer's Disease-In the Hunt for Biomarkers <u>Kubis-Kubiak, A; Dyba, A and Piwowar, A</u> Apr 2020 INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 21 (8)	0	1	6	6	1	3.5	14
⊖ 9	Alzheimer's disease: New prospects in therapy and applied experimental models <u>Kubis, AM and Janusz, M</u> 2008 POSTEPY HIGIENY I MEDYCINY DOSWIADCZALNEJ 62, pp.372-392	0	2	2	0	1	0.88	14
⊖ 10	Studies on the mechanism of action of a proline-rich polypeptide complex (PRP): Effect on the stage of cell differentiation <u>Kubis, A; Marcinkowska, E; (...); Lisowski, J</u>	0	1	0	1	0	0.68	13

MENU

	Nov 2005 PEPTIDES 26 (11), pp.2188-2192							
⊖ 11	<p>The Impact of High Glucose or Insulin Exposure on S100B Protein Levels, Oxidative and Nitrosative Stress and DNA Damage in Neuron-Like Cells</p> <p>Kubis-Kubiak, A; Wiatrak, B and Piwowar, A</p> <p>Jun 2021 INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 22 (11)</p> <p> Enriched Cited References</p>	0	0	2	3	1	2	6
⊖ 12	<p>Effect of amyloid-beta on the redox system activity in SH-SY5Y cells preincubated with lipopolysaccharide or co-cultured with microglia cells</p> <p>Wiatrak, B; Jawien, P; (...); Kubis-Kubiak, A</p> <p>May 2022 Mar 2022 (Early Access) BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY 149</p>	0	0	0	3	1	2	4
⊖ 13	<p>Epigenetic modifications: An important mechanism in diabetic disturbances</p> <p>Rorbach-Dolata, A; Kubis, A and Piwowar, A</p> <p>Nov 29 2017 POSTĘPY HIGIENY I MEDYCYNY DOSWIADCZALNEJ 71, pp.960-974</p>	1	0	1	1	0	0.43	3
⊖ 14	<p>Hyper-glycemia and insulinemia induce morphological changes and modulate secretion of S100B, S100A8, amyloid? 1-40 and amyloid? 1-42, in a model of human dopaminergic neurons</p> <p>Kubis-Kubiak, A; Wiatrak, B and Piwowar, A</p> <p>Dec 2022 Oct 2022 (Early Access) BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY 156</p>	0	0	0	0	0	0	0
⊖ 15	<p>Three-dimensional Collagen Scaffolds in Cultures of Olfactory Ensheathing Cells Used for Severed Spinal Cord Regeneration</p> <p>Fortuna, W; Wiatrak, B; (...); Tabakow, P</p> <p>Sep-oct 2022 IN VIVO 36 (5), pp.2032-2041</p>	0	0	0	0	0	0	0

© 2022 Clarivate
 Training Portal
 Product Support

Data Correction
 Privacy Statement
 Newsletter

Copyright Notice
 Cookie Policy
 Terms of Use

Ustawienia plików cookie

Follow Us