Załącznik nr. 2

Anna Agata Leśniak

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych
(wersja w języku polskim)

"Rola modulacji aktywności układu opioidowego w wybranych procesach patologicznych układu nerwowego."

Zakład Farmakodynamiki i Patofizjologii

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2019

1. Imię i Nazwisko: Anna Agata Leśniak

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

2013	Uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie Tytuł rozprawy doktorskiej: "Analiza efektu przeciwbólowego nowych analogów neuropeptydów w mysim modelu bólu nowotworowego".
2007 - 2013	Studia doktoranckie w Zakładzie Neuropeptydów Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Andrzeja W. Lipkowskiego.
2007	Uzyskanie stopnia magistra inżyniera biotechnologii w specjalności: "Biotechnologia w produkcji i ochronie zdrowia zwierząt" na Międzywydziałowym Studium Biotechnologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Tytuł pracy magisterskiej: "Analiza polimorfizmu genów wybranych receptorów węchowych i jego wpływ na zdolność psów do wykrywania lotnych markerów nowotworów, indywidualnego zapachu ludzkiego, narkotyków i materiałów wybuchowych" pod kierunkiem prof. dr hab. Kazimierza Jaszczaka.
2003-2007	Studia magisterskie na Międzywydziałowym Studium Biotechnologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

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

2016 - obecnie	Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Zakład Farmakodynamiki i Patofizjologii. Stanowisko: adiunkt – pracownik badawczo-dydaktyczny
2014 - 2015	Wydział Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Biomedycznego w Uppsali (Uppsala Universitet Biomedicinskt Centrum). Stanowisko: pracownik badawczy w ramach stażu podoktorskiego.
2013 - 2014	Wydział Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Biomedycznego w Uppsali (Uppsala Universitet Biomedicinskt Centrum). Stanowisko: stażysta podoktorski (stypendium naukowe).
2012 - 2013	Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie. Stanowisko: specjalista

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. 2016 r. Poz. 882 ze zm. W dz. U. Z 2016 r. Poz. 1311.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

"Rola modulacji aktywności układu opioidowego w wybranych procesach patologicznych układu nerwowego."

b) monotematyczny cykl publikacji zawiera następujące publikacje naukowe (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, współczynnik wpływu Impact Factor IF oraz punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - MNiSW)*

H1. Lesniak A [pierwszy autor], Pick CG, Misicka A, Lipkowski AW, Sacharczuk M. Biphalin protects against cognitive deficits in a mouse model of mild traumatic brain injury (mTBI). Neuropharmacology. 2016, 101:506-518. IF = 3,756 , Punkty MNiSW = 35.

H2. Lesniak A [pierwszy autor], Leszczynski P, Bujalska-Zadrozny M, Pick CG, Sacharczuk M. Naloxone exacerbates memory impairments and depressive-like behavior after mild traumatic brain injury (mTBI) in mice with upregulated opioid system activity. Behav Brain Res. 2017, 30;326:209-216. IF = 3,713 , Punkty MNiSW = 30.

H3. Poznanski P, **Lesniak A [pierwszy autor ex aequo]**, Bujalska-Zadrozny M, Strzemecka J, Sacharczuk M. Bidirectional selection for high and low stress-induced analgesia affects G-protein activity. Neuropharmacology. 2019, 144:37-42. IF = 4,249, Punkty MNiSW = 40.

H4. Lesniak A [autor korespondencyjny], Chmielewska D, Poznanski P, Strzemecka J, Bujalska-Zadrozny M, Sacharczuk M. Divergent response to cannabinoid receptor stimulation in high and low stress-induced analgesia mouse lines is associated with differential G-protein activation. Neuroscience. 2019, 404:246-258. IF = 3,382, Punkty MNiSW = 25.

H5. Sacharczuk M, **Lesniak A**, Lipkowski AW, Korostynski M, Przewlocki R, Sadowski B. Association between the A107V substitution in the delta-opioid receptors and ethanol drinking in mice selected for high and low analgesia. Addict Biol. 2014, 19:643-651. IF = 5,359 , Punkty MNiSW = 45.

H6. Lesniak A [pierwszy autor], Bochynska-Czyz M, Sacharczuk M, Benhye S, Misicka A, Bujalska-Zadrozny M, Lipkowski AW. Biphalin preferentially recruits peripheral opioid receptors to facilitate analgesia in a mouse model of cancer pain - A comparison with morphine. Eur J Pharm Sci. 2016 Jun 30;89:39-49. IF = 3,756, Punkty MNiSW = 35.

**Oświadczenia współautorów wraz z określeniem indywidualnego procentowego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 4. Szczegółowy opis mojego wkładu w powstanie powyższych prac został umieszczony w załączniku 5.*

Sumaryczna liczba publikacji stanowiących całość osiągnięcia naukowego: **6**

Łączny Impact Factor publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: **24,931**

Łączna liczba punktów MNiSW publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: **215**

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- 28 prac oryginalnych, opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). W 9 pracach byłam pierwszym autorem bądź autorem korespondencyjnym.
- 3 prac przeglądowych z czego 2 zostały opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). W 1 pracy byłam pierwszym autorem.
- 34 streszczeń konferencyjnych (9 międzynarodowych i 25 krajowych), w tym 3 wystąpienia ustne.
- udział w 8 projektach badawczych finansowanych przez NCN/MNiSW/WUM/IGHZ (działalność statutowa). W 2 pełniłam rolę kierownika projektu.

- Liczba cytowań wg. bazy Web of Science (na dzień 21.02.19) bez autocytowań: **139**
- Indeks Hirscha wg. bazy Web of Science (na dzień 21.02.19): **8**

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

Wprowadzenie:

Układ opioidowy stanowi jeden z ewolucyjnie konserwatywnych systemów, którego głównym zadaniem jest modulacja odpowiedzi na bodźce bólowe. Jednakże, układ opioidowy zaangażowany jest również w szereg innych procesów fizjologicznych i patologicznych takich jak: i) kontrolowanie zachowań związanych z odczuwaniem przyjemności i predyspozycji do rozwoju uzależnienia [1-2]; ii) regulacja odpowiedzi emocjonalnej na stres oraz związane z nią ryzyko rozwoju zachowań depresyjnych czy lękowych [3]; iii) regulacja homeostazy jonowej, pobudliwości komórek i ich proliferacji istotnych z punktu widzenia właściwości neuroprotekcyjnych czy nowotworzenia [4-6]; iv) modulacja hemodynamiki krążenia i procesów oddechowych istotna w kwestii wystąpienia depresji oddechowej [6]. W związku z tym, aktywność układu opioidowego może rzutować na szereg procesów patologicznych, w tym zaburzenia wrażliwości na ból, osłabienia odpowiedzi przeciwbólowej na analgetyki pobudzające receptory związane z białkiem G (GPCR), podatnością na uzależnienia, nowotwory, depresję czy zaburzenia natury poznawczej.

Aktywacja endogennego układu opioidowego jest jednym ze zjawisk towarzyszących reakcji stresowej. Liczne doniesienia potwierdzają istotną, modulacyjną rolę zarówno egzogennych opioidów jak i endogennych peptydów opioidowych w regulacji odpowiedzi na stres. Efekt ten polega na wywieraniu działania hamującego na oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) poprzez hamujące działanie na neurony uwalniające czynnik uwalniający kortykotropinę (CRF) oraz hamowanie uwalniania noradrenaliny wywierającej działanie pobudzające wydzielanie CRF [7]. Endogenny układ opioidowy bierze więc udział w osłabieniu przedłużającej się reakcji stresowej oraz jej niekorzystny wpływ na ustrój. Wykazano, iż delecja genów prekursorów endogennych peptydów opioidowych wzmaga reakcję na stres w modelu zwierzęcym, objawiającą się wzrostem poziomu kortykosteronu. Dodatkowo, delecja genu proenkefaliny czy receptora typu δ, skutkuje nasileniem zachowań lękowych czy depresyjnych po ekspozycji na bodziec stresowy [8-10]. Również nosicielstwo allelu G w jednym z najszerzej opisanych polimorfizmów pojedynczego genu (SNP) w receptorze typu μ - A118G, związane jest ze zwiększoną wrażliwością na ból, osłabioną reakcją na morfinę i kortyzol, zwiększoną podatnością na idiopatyczną padaczkę czy

schizofrenię [11-12]. Badania farmakologiczne dostarczyły natomiast dowodów, iż wzrost poziomu adrenokortykotropinę (ACTH) i kortyzolu wskutek hamowania aktywności układu opioidowego przy zastosowaniu naloksonu, jest skorelowany z silniejszą odpowiedzią na stresor o charakterze socjalnym i może stanowić ryzyko rozwoju depresji [13-14]. Opioidy, zwiększając uwalnianie dopaminy w szlaku mezolimbicznym odpowiedzialne są również za działanie nagradzające alkoholu. Spożywanie alkoholu wiąże się również ze zwiększeniem uwalniania endorfin w jądrze półleżącym [15-16], co może predysponować do rozwoju uzależnienia. Osłabienie aktywności endogennego układu opioidowego objawiającego się uszczupleniem endogennych zasobów β - endorfin wskutek chronicznego przyjmowania opioidów, może również prowadzić do wydłużenia i nasilenia objawów abstynencyjnych (związanych ze wzrostem uwalniania noradrenaliny). Zjawisko to może więc zwiększać ryzyko nawrotu uzależnienia [17]. Osłabienie aktywności endogennego układu opioidowego może również być przyczyną rozwoju przewlekłych stanów bólowych np. fibromialgii czy zachowań autoagresywnych [18-19]. Nadaktywność układu opioidowego objawiającego się znaczącym wzrostem poziomu β - endorfin, obserwuje się natomiast w zaburzeniach ze spektrum autyzmu oraz u pacjentów poddanych terapii zastępczej metadonem. Zwiększona aktywność endogennego układu opioidowego jest najprawdopodobniej przyczyną typowej dla zaburzeń autystycznych chęci ograniczenia interakcji międzyludzkich, skutkujących wzrost poziomu β-endorfin [20-22].

Aktywacja receptorów opioidowych zdaje się również pełnić funkcję protekcyjną w urazach OUN, wywołanych działaniem siły mechanicznej czy też w wyniku niedokrwienia i hipoksji. Co więcej, myszy pozbawione genu receptora opioidowego μ, wykazywały zaburzenia pamięci przestrzennej związanej z osłabieniem długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) w hipokampie [23]. Także, farmakologiczna blokada receptorów opioidowych μ w regionie CA3 hipokampa, przyczyniała się do upośledzenia pamięci przestrzennej [24]. Badania post-mortem również wykazały, iż obniżona gęstość receptorów opioidowych może stanowić czynnik przyczyniający się do wystąpienia zaników pamięci u pacjentów z chorobą Alzheimera [25-26].

Podsumowując, wiele doniesień literaturowych potwierdza zależność pomiędzy aktywnością układu opioidowego a potencjalnymi predyspozycjami do chorób układu nerwowego warunkowanych niekorzystnymi efektami stresu, w tym zaburzeń afektywnych, neurologicznych czy rozwoju uzależnienia.

Głównymi celami przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego było:

1. Ustalenie znaczenia modulacji aktywności układu opioidowego przez dimeryczny peptyd opioidowy - bifalinę w bólu przewlekłym oraz w zaburzeniach funkcji poznawczych w następstwie lekkiego urazowego uszkodzenia mózgu (mTBI) [**H1, H2** oraz **H6**].
2. Ustalenie wpływu zróżnicowanej aktywności endogennego układu opioidowego jako czynnika predysponującego do rozwoju zaburzeń depresyjnych i podatności na uzależnienie od alkoholu [**H5**].
3. Próba określenia molekularnego podłoża zróżnicowanej aktywności endogennego układu opioidowego i kanabinoidowego w modelu badawczym myszy selekcjonowanych w kierunku wysokiej (HA) i niskiej (LA) analgezji postresowej [**H3** oraz **H4**].

Omówienie uzyskanych wyników:

1. ***Ustalenie znaczenia modulacji aktywności układu opioidowego przez dimeryczny peptyd opioidowy - bifalinę w bólu chronicznym oraz zaburzeniach funkcji poznawczych w następstwie lekkiego urazowego uszkodzenia mózgu (mTBI).***

Lekkie urazowe uszkodzenie mózgu (mTBI) definiowane jest jako zaburzenie fizjologicznych funkcji mózgu wskutek działania sił zewnętrznych. Jest ono jednym z najczęstszych typów urazów OUN u ludzi młodych [27]. Stan ten objawia się wystąpieniem następujących objawów: i) utrata świadomości krótsza niż 30 min.; ii) utrata pamięci związana ze zdarzeniami tuż przed i tuż po urazie, trwająca nie dłużej niż 24h; iii) wystąpienie ogniskowych objawów neurologicznych klasyfikowanych w skali Glasgow na poziomie 13-15 punktów; iv) wystąpienie objawów somatycznych w postaci bólów głowy, nudności i wymiotów, zaburzeń widzenia, zawrotów głowy czy męczliwości [28-29]. Zazwyczaj pacjenci, którzy doświadczyli mTBI, wracają do pełni zdrowia w przeciągu 3-12 miesięcy, jednakże według najnowszych szacunków w znacznie więcej niż 15% przypadków, pacjenci doświadczają przewlekłych problemów natury poznawczej w postaci deficytów pamięciowych, zaburzeń uwagi czy szybkości przetwarzania informacji [30]. U pacjentów tych, rzadko obserwuje się jednak zmiany w obrazie tomografii komputerowej (CT) czy funkcjonalnym rezonansie magnetycznym (fMRI), co ogranicza możliwość wdrożenia wczesnej terapii. Powyższy stan spowodowany jest najprawdopodobniej niewystarczającą czułością wspomnianych metod diagnostycznych [31-32]. Jednakże, badania na przestrzeni kilku ostatnich lat przemawiają za przydatnością techniki obrazowania MRI z użyciem

tensora dyfuzji (MRI-DTI) we wczesnej diagnostyce zaburzeń poznawczych powstałych wskutek mTBI [33]. Trwają również intensywne badania nad opracowaniem i opatentowaniem panelu biomerkerów z krwi obwodowej pacjenta, mogących przyczynić się do skuteczniejszej diagnostyki skutków mTBI [34]. Znaczącą grupę pacjentów o podwyższonym ryzyku doznania mTBI stanowią zawodnicy sportów kontaktowych oraz żołnierze [35-36]. Ci ostatni należą ponadto do pacjentów u których ryzyko wystąpienia bólu przewlekłego stanowi poważny problem kliniczny. U sportowców natomiast, urazom głowy często towarzyszą dodatkowe powikłania (np. ortopedyczne) wymagające zastosowania doraźnej terapii przeciwbólowej.

Opioidy stanowią jedną z najskuteczniejszych grup leków przeciwbólowych. Dotychczasowe obserwacje wskazują, iż ponad 20% pacjentów ze zdiagnozowanymi problemami natury psychologicznej czy poznawczej w wyniku mTBI, poddanych zostaje leczeniu opioidami ze względu na występowanie u nich przewlekłego bólu [37-38]. Ten rodzaj bólu stanowi ponadto nieodłączną składową choroby nowotworowej, która w znacznym stopniu pogarsza jakość życia pacjenta [39-40]. Łagodzenie bólu o charakterze przewlekłym, ze względu na jego złożony charakter, często jest niewystarczające, nawet po zastosowaniu silnie działających klasycznych leków opioidowych. Ponad połowa pacjentów cierpi z powodu bólu określanego jako umiarkowany bądź silny. Dodatkowo, stosowanie opioidów może być ograniczone z uwagi na ryzyko występowania działań niepożądanych w tym tolerancji, zależności opioidowej, sedacji, depresji oddechowej, czy też hiperalgezji [41]. Większość tych działań jest związana z działaniem opioidów na poziomie OUN [42]. Jednakże, opioidy mogą wywierać działanie analgetyczne przez obwodowy mechanizm, poprzez wiązanie się z receptorami opioidowymi na wolnych zakończeniach neuronów czuciowych. W szeregu wcześniejszych badań w modelach zwierzęcych jak i z udziałem pacjentów wykazano, iż miejscowe podanie opioidów przenikających przez barierę krew-mózg, np. morfiny czy też opioidów nieprzenikających do OUN, np. loperamidu, skutkuje uzyskaniem znacznej analgezji w bólu zapalnym, neuropatycznym czy nowotworowym [43-48]. Obserwacje te nie są zaskoczeniem, gdyż rozwój tych rodzajów bólu prowadzi do wzrostu ekspresji receptorów opioidowych w tkankach obwodowych [49]. W sytuacji konieczności systemowego podania opioidu, należy jednak zwrócić uwagę na stopień jego penetracji do OUN, który może wiązać się z ryzykiem wystąpienia ośrodkowych działań niepożądanych. Dlatego też, zastosowanie opioidu o ograniczonej przenikalności przez barierę krew-mózg zdaje się być korzystniejszym rozwiązaniem z punktu widzenia chęci ograniczenia wspomnianych wcześniej działań niepożądanych. [50].

Mając na uwadze powyższy fakt, w badaniach własnych opisanych w publikacji **H6: *Lesniak A, Bochynska-Czyz M, Sacharczuk M, Benhye S, Misicka A, Bujalska-Zadrozny M, Lipkowski AW. Biphalin preferentially recruits peripheral opioid receptors to facilitate analgesia in a mouse model of cancer pain - A comparison with morphine. Eur J Pharm Sci. 2016 Jun 30;89:39-49*** **(wyniki zaprezentowane zostały na konferencjach Z1**, **Z2, Z3, Z4, Z6, Z7, Z10, Z11, Z12, Z14**) postanowiłam porównać efektywność dożylnego podania bifaliny - opioidu o budowie peptydowej o ograniczonym przenikaniu do OUN oraz morfiny - alkaloidu, który stosunkowo łatwo przenika przez barierę krew-mózg w modelu przewlekłego bólu nowotworowego. Bifalina jest dimeryczną pochodną enkefaliny, którą charakteryzuje: i) silne powinowactwo do wszystkich 3 typów receptorów opioidowych [51]; ii) silniejsze działanie przeciwbólowe po podaniu ośrodkowym w porównaniu do morfiny oraz iii) mniejsze ryzyko wywołania działań niepożądanych w postaci np. zależności opioidowej [52-54]. W hipotezie badawczej postawionej w pracy założono, iż bifalina będzie wykazywać silniejsze niż morfina miejscowe działanie analgetyczne poprzez stymulację receptorów opioidowych w tkance zmienionej nowotworowo.

Najważniejszym osiągnięciem opisywanej pracy było wykazanie, iż bifalina w porównaniu z morfiną silniej aktywuje obwodowe receptory opioidowe zlokalizowane na wolnych zakończeniach nerwów czuciowych (bifalina: ED_{50} = 19,1 μmol/kg vs. morfina: ED_{50} = 30,5 μmol/kg)(Rycina 6). Silniejsza aktywacja obwodowych receptorów opioidowych po podaniu bifaliny w odniesieniu do morfiny może wynikać z: i) 10 - i 80 - krotnie silniejszego powinowactwa bifaliny do receptorów typu μ i δ (Rycina 7, Tabela 2); ii) ponad 1,5 - krotnie większej skuteczności aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych zależnych od białka G; iii) ograniczoną przenikalnością bifaliny przez wysoce selektywną barierę krew-mózg [55-56]. W toku dalszych badań postanowiłam ocenić potencjał obu związków do wywołania zjawiska tolerancji, która stanowi poważny problem kliniczny. Bifalina, po subchronicznym podaniu słabiej niż morfina indukowała zjawisko ośrodkowej tolerancji opioidowej (Rycina 9). Co zaskakujące, zaobserwowałam znaczne osłabienie obwodowego działania analgetycznego bifaliny. Podobną obserwację poczyniłam również dla morfiny (Rycina 8). Wyniki świadczące o wystąpieniu tolerancji obwodowej stanowią zaskakującą obserwację, gdyż zjawisko to nie jest szeroko opisywane w literaturze [57-58]. Wydaje się, że przyczyną tego zjawiska może być obniżenie ekspresji receptorów opioidowych w ciałach neuronów zwojów korzeni grzbietowych [59] lub w komórkach nowotworowych [60] czy też zmiany epigenetyczne [61]. Niemniej jednak, wyniki uzyskane w pracy **H6** jednoznacznie wskazują na korzyści płynące z zastosowania bifaliny w

łagodzeniu bólu nowotworowego z uwagi na jej obwodowy mechanizm działania Najnowsze badania sugerują, iż wystąpienie zaburzeń poznawczych czy psychicznych będących konsekwencją mTBI, zwiększa odsetek pacjentów przyjmujących opioidy [38]. Zastosowanie opioidów jako leków I rzutu u pacjentów, którzy doświadczyli mTBI jest przeciwwskazane ze względu na możliwość wystąpienia lub nasilenia działań niepożądanych natury neuropsychologicznej [62]. Istnieje jednak niewiele badań dotyczących wpływu opioidów na deficyty poznawcze w postaci zaburzeń pamięci i uczenia się po doznanym mTBI. Dodatkowo te badania, zwłaszcza dotyczące mechanicznego urazu głowy nie są jednoznaczne [63-64].

Wcześniejsze obserwacje owego zagadnienia wskazują na korzystny efekt blokowania receptorów opioidowych (głównie typu κ) przez wysokie dawki naloksonu czy też selektywnych antagonistów tego receptora, na parametry fizjologiczne po doznanym urazie mózgu [65-66]. Późniejsze badania sugerują natomiast na neuroprotekcyjny efekt aktywacji receptorów μ i δ. Mając na uwadze fakt, iż wpływ podania opioidów na funkcje kognitywne i neuropsychologiczne zaburzone w wyniku mechanicznego urazu głowy, nie został dotychczas określony [67-69] w kolejnej opublikowanej pracy **H1**: ***Lesniak A, Pick CG, Misicka A, Lipkowski AW, Sacharczuk M. Biphalin protects against cognitive deficits in a mouse model of mild traumatic brain injury (mTBI). Neuropharmacology. 2016 Feb;101:506-18*** **(nagrodzona nagrodą N4 oraz zaprezentowana na konferencjach Z20, Z30 i Z31)** podjęłam próbę wyjaśnienia tego zjawiska. W badaniach oceniałam wpływ bifaliny, dimerycznej enkefaliny wykazującej silne powinowactwo do receptorów opioidowych μ i δ [70], na pamięć przestrzenną i rozpoznawczą a ponadto nasilenie zachowań depresyjnych i lękowych. Do wywołania tych zaburzeń posłużył opisany w piśmiennictwie model badawczy polegający na wywołaniu mTBI poprzez uderzenie 30 g odważnika w płat skroniowy myszy laboratoryjnej. Powyższy model badawczy charakteryzuje się wystąpieniem długotrwałych zaburzeń pamięciowych, pozwalając tym samym na zgłębienie patofizjologii mTBI czy ocenę neuroprotekcyjnego działania opioidów [71]. Wyniki (zilustowane na Rycinach 1 i 2 w publikacji **H1**) potwierdziły, iż w zastosowanym modelu badawczym dochodzi do upośledzenia pamięci przestrzennej objawiającej się wydłużeniem czasu odnalezienia ukrytej platformy w teście labiryntu wodnego Morrisa (MWM).

W niniejszej pracy określiłam wpływ bifaliny na zaburzenia pamięciowe obserwowane 7 dni od wywołania urazu poprzez: 1) podanie bezpośrednio po mTBI, 2) podanie 2h po mTBI oraz 3) subchroniczne podawanie przez 7 dni po mTBI. Jednorazowe podanie bifaliny bezpośrednio po wywołaniu mTBI, jak również subchroniczne jej podawanie przez okres 7

dni zahamowało niekorzystny wpływ mTBI na pamięć przestrzenną do poziomu obserwowanego u myszy nie poddanych urazowi. Ponadto, wyżej opisane działanie bifaliny było obserwowane również po jej podaniu 2 godziny po mTBI. Korzystny wpływ bifaliny na pamięć przestrzenną związany był z aktywacją receptorów opioidowych, o czym świadczy odwrócenie tego efektu przez nalokson. Podobne działanie bifaliny obserwowano w przypadku deficytów pamięci rozpoznawczej, pozwalającej na odróżnienie znanych od nieznanych zjawisk sensorycznych (wyniki zilustrowano na Ryc. 9 w publikacji **H1**). Uzyskane wyniki sugerują więc istotną, neuroprotekcyjną rolę opioidów w pierwszym tygodniu po doznanym urazie.

Wydaje się, że neuroprotekcyjne działanie opioidów pojawiające się w pierwszych dniach po doznanym urazie, może być związane z przywróceniem homeostazy jonowej i hamowaniem ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów. W przeciągu kilku minut po urazie dochodzi do uruchomienia kaskady różnych szlaków neurometabolicznych w tym gwałtownego uwolnienia aminokwasów pobudzających (EAA) w wyniku niekontrolowanego otwarcia kanałów K^+. Postuluje się, iż zaburzenia poznawcze, obserwowane w wyniku mTBI wynikają z zaburzeń neuroplastyczności, wskutek nagromadzenia glutaminianu poza przestrzenią synaptyczną [72]. Proces nadmiernej depolaryzacji neuronów prowadzi do aktywacji receptorów NMDA przez EAA i wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+}, który utrzymuje swój wysoki poziom do paru dni po urazie [73]. Neuroprotekcyjne działanie opioidów w pierwszych minutach i dniach po urazie, najprawdopodobniej wynika ze zmniejszenie stężenia wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} oraz hamowania wypływu jonów K^+ za pośrednictwem pobudzenia receptora opioidowego δ [74-75]. Ekscytotoksyczność jest ważnym czynnikiem indukującym apoptozę i nekrozę neuronów [76]. W pracy **H1** wykazałam, iż bifalina hamuje zależny od aktywacji receptorów opioidowych proces neurodegeneracji neuronów korowych i hipokampa (wyniki zilustrowano na Rycinach 11 i 13).

Kolejną konsekwencją mTBI są zaburzenia depresyjne [77] objawiające się po 30-u dniach. Wyniki zawarte w pracy **H1** wykazały (Rycina 8), iż podanie bifaliny bezpośrednio po urazie częściowo łagodzi zachowania depresyjne. Wykazano, że potencjalne mechanizmy przeciwdepresyjnego działania opioidów obejmują stymulację uwalniania dopaminy w prążkowiu i jądrze półleżącym czy też zwiększenie stężenia neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) w mózgu [78-79]. Opioidy wzmagają również wydzielanie noradrenaliny w korze przedczołowej oraz hamują wychwyt zwrotny monoamin [80-81].

Poczyniona przeze mnie obserwacja wskazująca na przeciwdepresyjne działanie bifaliny nasunęła pytanie, czy endogenna aktywność układu opioidowego może mieć wpływ na nasilenie zachowań depresyjnych pojawiających się po mTBI. Wcześniejsze obserwacje innych grup badawczych wykazały bowiem, iż poziom aktywacji układu opioidowego może stanowić czynnik ryzyka w rozwoju zaburzeń afektywnych [82] a także warunkować odpowiedź na leki przeciwdepresyjne [83-84]. Warto wspomnieć, iż występowanie jednego z najszerzej opisanych polimorfizmów, A118G w genie receptora opioidowego μ skutkującego utratą funkcji i obniżoną ekspresją [85], predysponuje do rozwoju zachowań depresyjnych [86]. Niewiele jest jednak badań opisujących wpływ genetycznie zróżnicowanej aktywności endogennego układu opioidowego na nasilenie zaburzeń afektywnych czy funkcji poznawczych, będących konsekwencją mTBI. Stąd, następnym krokiem w moich badaniach było zgłębienie owego zagadnienia, czego owocem stała się publikacja **H2: *Lesniak A, Leszczynski P, Bujalska-Zadrozny M, Pick CG, Sacharczuk M. Naloxone exacerbates memory impairments and depressive-like behavior after mild traumatic brain injury (mTBI) in mice with upregulated opioid system activity. Behav Brain Res. 2017 May 30;326:209-16* (wyniki zaprezentowane zostały na konferencji Z23).**

Model badawczy stanowiły myszy selekcjonowane w kierunku wysokiej (HA) i niskiej (LA) analgezji postresowej, wywołanej wymuszonym pływaniem (SSIA) w wodzie o temperaturze 20°C [87]. Najbardziej charakterystyczną cechą różnicującą obie linie jest skrajnie odmienna odpowiedź antynocyceptywna na bodziec stresowy oraz wrażliwość na ligandy receptorów opioidowych. Myszy linii HA wykazują nadaktywność endogennego układu opioidowego przejawiającą się silną SSIA oraz silną odpowiedzią na ligandy receptorów opioidowych. Myszy LA wykazują obniżoną wrażliwość na analgetyki opioidowe zaś SSIA ma charakter szczątkowy [88-89]. Co ciekawe, myszy HA i LA różnią się między sobą w kontekście podatności na zaburzenia depresyjne i odpowiedź na leki przeciwdepresyjne. Myszy HA wykazują większą podatność na rozwój zaburzeń depresyjnych zarówno na poziomie podstawowym jak i w warunkach stresowych. Myszy linii HA są również bardziej wrażliwe na działanie dezypraminy [90-91]. Najistotniejszym wynikiem przedstawionym w publikacji **H2** była obserwacja, iż nadaktywność endogennego układu opioidowego przeciwdziała rozwojowi zachowań depresyjnych powstałych w wyniku mTBI (Rycina 6) a także hamuje pojawienie się deficytów pamięci przestrzennej po mTBI (Rycina 3). U myszy linii LA, zaburzenia pamięci przestrzennej powstałe w konsekwencji mTBI, były zdecydowanie bardziej widoczne niż u myszy HA. Co więcej, podanie naloksonu u myszy HA poddanych mTBI wyraźnie upośledziło pamięć przestrzenną do poziomu

obserwowanego u myszy linii LA. Podobną zależność zaobserwowałam podczas oceny nasilenia zachowań depresyjnych. Obserwacje te są spójne z wynikami badań klinicznych prowadzonych na pacjentach obciążonych polimorfizmem A118G, skutkującym osłabieniem neuroprzekaźnictwa zależnego od receptora μ. Homozygoty GG znacznie częściej niż osobniki o genotypie dzikim czy heterozygotycznym, przejawiały cechy charakterystyczne dla ciężkiej depresji endogennej [92]. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, objawy depresji skorelowane są również z osłabieniem uwalniania endogennych opioidów [93].

2. ***Ustalenie wpływu zróżnicowanej aktywności układu opioidowego jako czynnika predysponującego do rozwoju zaburzeń depresyjnych i podatności na uzależnienie od alkoholu.***

Rozwój zaburzeń depresyjnych czy wskutek mTBI, czy też chronicznego stresu często skorelowany jest z nasileniem spożycia alkoholu [94]. Układ opioidowy w warunkach nadaktywności, odpowiada za niskie spożycie alkoholu u myszy linii HA, natomiast w przypadku dysfunkcji tego układu prowadzi do wzrostu spożycia i preferencji alkoholu u myszy linii LA w warunkach chronicznego stresu środowiskowego (CMS)[95]. Aktywacja endogennego układu opioidowego jest istotna z punktu widzenia przywrócenia homeostazy po zadziałaniu bodźca stresowego. Opioidy hamują emocjonalną komponentę zachowań stresowych takich jak zwiększona czujność, nasilone zachowania unikania czy zachowania agresywne [96]. W sytuacji dysfunkcji endogennego układu opioidowego u myszy linii LA, najprawdopodobniej dochodzi do uruchomienia mechanizmów kompensacyjnych mających na celu nasilenie uwalniania endogennych opioidów. Jak wynika z danych literaturowych, etanol zwiększa ich uwalnianie [97]. Hipoteza ta jest zgodna z najnowszymi obserwacjami, w których u myszy linii LA spożywających alkohol zaobserwowano ok. 3-krotny wzrost poziomu β-endorfin w osoczu [98]. Kolejne badania przyniosły dowody na to, iż utrata β-endorfin z OUN wskutek uszkodzenia bariery krew-mózg spowodowanego mTBI czy podaniem hiperosmotycznego roztworu mannitolu, prowadzi do spadku spożycia alkoholu u myszy linii LA. Zjawisko to jest najprawdopodobniej konsekwencją zahamowania nagradzających właściwości etanolu [99]. Mając na uwadze powyższe obserwacje, można wysnuć hipotezę, iż poziom spożycia alkoholu może być zależny od uwarunkowanego genetycznie stanu funkcjonalnego receptorów opioidowych. U myszy linii HA i LA zidentyfikowano wcześniej funkcjonalny polimorfizm C320T w regionie kodującym receptora δ (A107V w strukturze białka), skutkujący osłabieniem zarówno SSIA jak i odpowiedzi na egzogenne ligandy tego receptora [100]. W pracy **H5: *Sacharczuk M,***

Lesniak A, Lipkowski AW, Korostynski M, Przewlocki R, Sadowski B. Association between the A107V substitution in the delta-opioid receptors and ethanol drinking in mice selected for high and low analgesia. Addict Biol. 2014, 19:643-651 **(nagrodzona nagrodą N3)** podjęto więc próbę określenia wpływu wspomnianego polimorfizmu A107V na poziom spożycia alkoholu przez myszy linii HA i LA oraz określenie ryzyka rozwoju uzależnienia od alkoholu. Najważniejszym odkryciem dokonanym w powyższej pracy, było wykazanie, iż receptor opioidowy typu δ pełni krytyczną rolę w determinacji predyspozycji do uzależnienia od alkoholu czy rozwoju zachowań depresyjnych, szczególnie w warunkach stresowych. Zarówno u heterozygotycznych osobników CT myszy linii HA jak i LA zaobserwowano wzrost spożycia i preferencji etanolu (Rycina 1 i 2 w publikacji **H5**). Zgodnie z założeniami, spożycie etanolu było zdecydowanie wyższe u myszy linii LA niż HA, szczególnie w warunkach CMS. Podobne wnioski wyciągnięto z badań nad spożyciem etanolu u transgenicznych myszy pozbawionych receptora δ [101]. Powyższe wyniki skłaniają do refleksji nad hamowaniem aktywności układu opioidowego w terapii uzależnienia od alkoholu.

Dysfunkcja receptora δ może sprzyjać również rozwojowi zaburzeń depresyjnych i lękowych. Koncepcja ta została już zaproponowana wcześniej w oparciu o wyniki badań z użyciem myszy transgenicznych [9]. U myszy linii HA, etanol całkowicie zniwelował prodepresyjny wpływ CMS u osobników o genotypie CC, a nieznacznie osłabił go u myszy o genotypie CT (Rycina 3). Natomiast, u myszy LA o genotypie CT poddanych CMS, zaobserwowano nasilenie zachowań depresyjnych, wynikające najprawdopodobniej z nadmiernego spożycia etanolu i jego toksycznego działania na OUN. Jednym z przypuszczalnych mechanizmów tłumaczących zjawisko nasilenia zachowań depresyjnych w wyniku nadmiernego spożycia alkoholu jest koncepcja spadku poziomu BDNF w OUN [102]. W najnowszych nieopublikowanych jeszcze badaniach mojego autorstwa, uzyskałam wyniki, które wskazują na powiązanie pomiędzy utratą BDNF przez rozszczelnioną na skutek stresu barierę krew-mózg, a nasileniem zachowań depresyjnych.

Reasumując, upośledzenie funkcji endogennego układu opioidowego może mieć wpływ nie tylko na stopień nasilenia przeciwbólowej reakcji na stres, lecz również pociąga za sobą inne konsekwencje w postaci zwiększonej wrażliwości na zaburzenia kognitywne i psychiczne wskutek mechanicznego uszkodzenia OUN czy też zwiększenie ryzyka uzależnienia od alkoholu w odpowiedzi na stres. Jednym z domniemanych mechanizmów zróżnicowania odpowiedzi myszy linii HA i LA na endogenne opioidy jest wspomniany już wcześniej polimorfizm A107V w receptorze δ. Jednakże, polimorfizm ten został

zidentyfikowany u 16% osobników linii myszy HA i 35% osobników myszy linii LA. Nie stanowi on więc jedynego czynnika decydującego o tak silnym zróżnicowaniu w aktywności endogennego układu opioidowego pomiędzy omawianymi liniami myszy. Pomimo prowadzonych od wielu lat badań, dotychczas nie udało się uzyskać jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie. Jak dotąd udało się określić, iż to zjawisko nie jest związane z poziomem ekspresji receptorów opioidowych czy prekursorów endogennych peptydów opioidowych. Zidentyfikowano jedynie niewielkie różnice w poziomie ekspresji receptorów δ i prodynorfiny pomiędzy myszami linii HA i LA (dane nieopublikowane).

3. ***Próba określenia molekularnego podłoża zróżnicowanej aktywności układu opioidowego w modelu badawczym myszy selekcjonowanych w kierunku wysokiej (HA) i niskiej (LA) analgezji postresowej.***

W kolejnej pracy **H3*: Poznanski P, Lesniak A [pierwszy autor ex aequo], Bujalska-Zadrozny M, Strzemecka J, Sacharczuk M. Bidirectional selection for high and low stress-induced analgesia affects G-protein activity. Neuropharmacology. 2019, 144:37-42* (nagrodzona nagrodą N8)** podjęłam się weryfikacji nowej hipotezy o istotnym znaczeniu wewnątrzkomórkowego systemu przekaźnictwa za pośrednictwem białek $G_{i/0}$ w zjawisku zróżnicowanej aktywności układu opioidowego u myszy linii HA i LA. Głównym założeniem badawczym było wykazanie, iż u myszy linii HA występuje silniejsza aktywacja białek $G_{i/0}$ w strukturach OUN odpowiedzialnych za modulację zstępujących szlaków hamowania bólu oraz w strukturach warunkujących emocjonalną odpowiedź na bodźce stresowe i bólowe. Najważniejszym osiągnięciem opisanym w pracy było wykazanie, iż u myszy HA charakteryzujących się zwiększoną aktywnością układu opioidowego, aktywacja białek $G_{i/0}$ wskutek stymulacji receptorów opioidowych μ była silniejsza we wzgórzu, podwzgórzu, istocie szarej okołowodociągowej (PAG), korze przedczołowej oraz w hipokampie w porównaniu z myszami linii LA (Tabela 2 i 3). Wzgórze jest strukturą pełniącą istotną rolę w przesyłaniu informacji nocyceptywnej do ośrodków korowych warunkując dyskryminacyjny i afektywno-motywacyjny aspekt doświadczenia bólowego. Pobudzenie receptorów opioidowych we wzgórzu osłabia przesyłanie informacji nocyceptywnej ze wzgórza do ośrodków korowych oraz hamuje wstępujący szlak bólowy na poziomie rdzenia kręgowego [103-104]. Doniesienia literaturowe wskazują na istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy aktywacją białek $G_{i/0}$ we wzgórzu a wrażliwością na ligandy receptorów opioidowych [105]. Podwzgórze stanowi natomiast kluczową strukturę regulującą odpowiedź autonomiczną na stres, a dzięki połączeniom z PAG i brzuszno-dogłowową

częścią rdzenia przedłużonego (RVM) stanowi część zstępującego szlaku hamowania bólu [106]. Aktywacja receptorów opioidowych w PAG za pośrednictwem RVM wywiera działanie hamujące na neurony I rzędu w rogach tylnych rdzenia kręgowego, co prowadzi do hamowania propagacji informacji nocyceptywnej do wyższych pięter OUN [107]. Aktywacja endogennego układu opioidowego w korze przedczołowej również przyczynia się do uzyskania efektu przeciwbólowego [108]. Nasilona aktywacja białek $G_{i/0}$ w wyniku stymulacji receptorów μ w hipokampie u myszy linii HA, może natomiast przyczyniać się do efektu neuroprotekcyjnego w sytuacji narażenia na urazy mechaniczne (np. w wyniku mTBI). Za tą koncepcją przemawiają wyniki przedstawione w pracy **H2**, w której myszy linii HA poddane mTBI wykazują mniej nasilone zaburzenia pamięci przestrzennej niż myszy linii LA.

Ciekawą i tym samym zaskakującą obserwacją było wykazanie zwiększonej aktywności białek $G_{i/0}$ w ciele migdałowatym u myszy linii LA, zwłaszcza, że jądro środkowe pełni ważną rolę w modulacji odpowiedzi bólowej (Tabela 2 i 3). Jednakże, pobudzenie receptorów opioidowych w ciele migdałowatym prowadzi również do nasilenia zachowań lękowych [109]. Z nieopublikowanych obserwacji wynika, iż myszy linii LA pomimo szczątkowej reakcji antynocyceptywnej na bodziec stresowy, wykazują widoczne zachowania objawiające się nadpobudliwością, silniejszymi reakcjami unikania i zachowaniami agresywnymi w reakcji na dotyk.

Koncepcję traktującą o istotnej roli aktywacji białek G jako potencjalnym podłożu zróżnicowania opisanych wcześniej cech pomiędzy myszami HA i LA, stanowią wyniki przedstawione w pracy **H4:** ***Lesniak A, Chmielewska D, Poznanski P, Strzemecka J, Bujalska-Zadrozny M, Sacharczuk M. Divergent response to cannabinoid receptor stimulation in high and low stress-induced analgesia mouse lines is associated with differential G-protein activation. Neuroscience. 2019, 404:246-258*** **(wyniki zaprezentowane zostały na konferencjach Z26, Z34)**. Powyższa praca zwraca uwagę na istotną kwestię wpływu nadaktywności bądź dysfunkcji układu opioidowego na wrażliwość na kanabinoidy. Badania nad właściwościami kanabinoidów cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem z uwagi na ich rosnące wykorzystanie kliniczne np. w terapii nudności wywołanych chemioterapią, bólu neuropatycznego czy lekoopornej padaczki [110-112]. Dlatego też, istotnym staje się określenie czynników wpływających na efektywność kanabinoidów oraz zidentyfikowanie molekularnego podłoża potencjalnych interakcji. Głównym celem pracy było sprawdzenie zaangażowania szlaków sygnałowych angażujących białka G w mechanizm odpowiedzi na stymulację receptorów kanabinoidowych w modelu mysim o zróżnicowanej aktywności układu opioidowego. Selekcja myszy HA i LA w

kierunku wysokiej i niskiej SSIA spowodowała, iż obie linie myszy charakteryzuje zróżnicowanie nie tylko pod względem wrażliwości na opioidy, ale również na nowotworzenie [113], zaburzenia afektywne [90, 114] czy padaczkę (nieopublikowane dane). Wyżej opisane schorzenia znajdują się na liście potencjalnych celów dla leków kanabinoidowych, których efektywność oraz działania niepożądane, zgodnie z hipotezą badawczą, mogą zależeć od endogennej aktywności układu opioidowego. Najważniejszym odkryciem w pracy **H4** było ustalenie, iż myszy linii HA i LA różnią się pod względem wrażliwości na agonistów receptorów kanabinoidowych związaną ze zróżnicowaniem w aktywacji białek $G_{i/0}$ oraz receptora CB_2. W toku badań wykazałam również, iż endogenny system kanabinoidowy w odróżnieniu od endogennego układu opioidowego, nie ulega aktywacji w odpowiedzi na stresor wymuszonego pływania (Rycina 9 i 10). Zgodnie ze stawianą hipotezą, myszy linii HA w porównaniu do myszy linii LA, wykazywały silniejszą dawkozależną odpowiedź behawioralną w postaci efektu antynocyceptywnego, katalepsji oraz zaburzeń lokomotorycznych na podanie nieselektywnego agonisty receptorów kanabinoidowych WIN55,212-2 (Ryciny 1-8). Powyższe efekty behawioralne zdają się być skorelowane z silniejszą aktywacją białek $G_{i/0}$ w strukturach takich jak PAG, wzgórze, kora czołowa czy prążkowie (Tabela 2 i 3). Zaburzenia motoryczne stanowią potencjalne działanie niepożądane kanabinoidów będących agonistami receptora CB_1. Obniżona aktywność układu opioidowego a także osłabiona neurotransmisja związana z aktywacją receptora CB_2 u myszy linii LA, przeciwdziała niekorzystnemu wpływowi agonistów receptorów kanabinoidowych na aktywność ruchową. Jednakże, u myszy linii LA obserwuje się silniejszą hipotermię po podaniu WIN55,212-2, co stanowi zaskakującą obserwację w świetle wcześniejszych wyników wskazujących na występowanie silniejszej hipotermii u myszy linii HA w wyniku pobudzenia endogennego układu opioidowego [115]. Powyższe obserwacje mogą mieć więc znaczenie kliniczne z punktu widzenia oceny efektywności terapii kanabinoidami oraz ryzyka wystąpienia działań niepożądanych.

Wnioski:

W przedstawionych pracach stanowiących cykl habilitacyjny wykazałam, że:

1. Silniejszy efekt analgetyczny bifaliny w porównaniu do morfiny obserwowany w modelu bólu nowotworowego wynika z silniejszego pobudzenia obwodowych receptorów opioidowych. Efekt ten może być związany z silniejszym powinowactwem bifaliny do

receptorów μ i δ, większą skutecznością aktywacji receptorów opioidowych oraz ograniczonym przenikaniem przez barierę krew-mózg [praca **H6**].

2. Podanie bifaliny wpływa korzystnie na poprawę funkcji poznawczych zaburzonych w wyniku urazu mózgu na drodze hamowania śmierci neuronów w ośrodkach korowych i hipokampie [praca **H1**].
3. Wysoka aktywność endogennego układu opioidowego warunkuje mniejsze ryzyko pojawienia się deficytów pamięciowych oraz zaburzeń depresyjnych w wyniku urazu mózgu [praca **H2**].
4. Zróżnicowanie aktywności endogennego układu opioidowego w mysim modelu badawczym o wysokiej i niskiej analgezji postresowej może częściowo wynikać z różnic w aktywacji białek $G_{i/0}$ w strukturach odpowiedzialnych za integrację i modulację bodźców bólowych [praca **H3**].
5. Zróżnicowana aktywność endogennego układu opioidowego pociąga za sobą tożsame zróżnicowanie we wrażliwości na związki kanabinoidowe związanej z poziomem aktywacji białek $G_{i/0}$ [praca **H4**].
6. Dysfunkcja receptora opioidowego typu δ wskutek wystąpienia polimorfizmu A107V nasila spożycie alkoholu oraz nasila zachowania depresyjne w warunkach ekspozycji na stres [praca **H5**].

<u>Najważniejsze osiągnięcia prowadzonych przeze mnie prac:</u>

1. Wykazanie korzyści płynących ze stosowania analogów endogennych opioidów w bólu przewlekłym [praca **H6**].
2. Wykazanie neuroprotekcyjnych właściwości egzogennych i endogennych opioidów w mechanicznym urazie mózgu [praca **H1 i H2**].
3. Wskazanie możliwego mechanizmu leżącego u podstawy zróżnicowanej wrażliwości na opioidy i kanabinoidy [praca **H3** i **H4**].
4. Wykazanie zależności pomiędzy dysfunkcją receptora typu δ a ryzykiem rozwoju uzależnienia od alkoholu oraz zachowań depresyjnych [praca **H5**].

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

a) działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Swoją działalność naukową rozpoczęłam w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu, gdzie prowadzałam badania w ramach pracy magisterskiej. Badania skierowany były w kierunku próby identyfikacji genetycznego podłoża wrażliwości węchowej psów służbowych poprzez analizę pojedynczych polimorfizmów nukleotydów (SNP) w wybranych genach receptorów węchowych. W pięciu analizowanych genach zidentyfikowałam 19 SNP, z których 11 skutkowało zmianą aminokwasu w strukturze białka receptorowego. Sześć SNP stanowiło nieopisywane jak dotąd polimorfizmy. Sekwencje zostały więc zdeponowane w bazie danych GeneBank pod numerami akcesyjnymi: EF451963.1, EF451965.1, EF451964.1, EF451962.1, NM_001083632.1 oraz NM_001083631.1. Co istotne, w badaniach zidentyfikowałam zależność pomiędzy występowaniem konkretnych SNP a uzyskiwanymi przez psy wynikami wykrywania danych markerów zapachowych. Opisałam, iż genotyp homozygotyczny GG w genie cOR52N9 oraz genotyp homozygotyczny AA w genie cOR9S13 wywiera niekorzystny wpływ na zdolności detekcji węchowej u psów. Owocem wspomnianych obserwacji stała się publikacja **O1**, która została następnie wyróżniona nagrodą **N1**.

Moje dalsze badania naukowe przeprowadzane były w ramach podjętych studiów doktoranckich w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie. Badania te, prowadzone w Zakładzie Neuropeptydów pod kierunkiem prof. Andrzeja W. Lipkowskiego, skupiały się w głównej mierze na ocenie właściwości analgetycznych nowych analogów endogennych peptydów opioidowych w ramach 6 Programu Ramowego Unii Europejskiej (grant 6FP STREP NORMOLIFE LSHC-CT-2006-037733). Badania obejmowały zarówno ocenę powinowactwa receptorowego w warunkach *ex vivo* jak i ich działania przeciwbólowego w zwierzęcych modelach bólu przewlekłego (neuropatycznego oraz nowotworowego). Dzięki odbyciu dwóch krótkoterminowych staży naukowych w 2010 i 2012 r. w Instytucie Badań Biologicznych Węgierskiej Akademii Nauk (Szeged, Węgry) zdobyłam wiedzę i umiejętności z zakresu oceny powinowactwa receptorowego związków metodą radioizotopową.

Przeprowadzone przeze mnie badania w ramach mojej pracy doktorskiej wykazały, iż modyfikacje strukturalne bifaliny w postaci zamiany D-Ala na D-Thr w pozycji 2 łańcucha peptydowego czy też zastąpienie mostka hydrazydowego łącznikiem karbonylodihydrazydowym, wpływają niekorzystnie na powinowactwo bifaliny do receptora

opioidowego typu μ oraz δ. Wykazałam również, iż bifalina oraz jeden z jej analogów wykazuje słabsze w porównaniu z morfiną działania niepożądane w postaci sedacji oraz tolerancji po podaniu subchronicznym.

Obserwacja ta skłoniła mnie również do zbadania skuteczności nowych peptydomimetyków o antagonistycznym działaniu wobec receptorów opioidowych w przeciwdziałaniu negatywnym skutkom hamowania perystaltyki jelitowej, będącej konsekwencją długotrwałego przyjmowania opioidów. Koncepcja ta, została poparta wynikami wskazującymi na działanie łagodzące zaparcia przy braku negatywnego wpływu na ośrodkowy efekt przeciwbólowy morfiny. Związki te dzięki silnie ograniczonej przenikalności przez bariery biologiczne, wykazują swoje działanie w świetle jelita. Powyższe badania zostały nagrodzone w 2012 r. na międzynarodowych targach innowacyjności Grand Prix Brussels Innova nagrodą **N2.**

W swojej pracy badawczej, uczestniczyłam również w badaniach określenia aktywności przeciwbólowej i przeciwnowotworowej nowych związków hybrydowych o charakterze agonistów receptora opioidowego i antagonistów receptora tachykininowego NK1. Moim zadaniem było określenie powinowactwa receptorowego badanych związków oraz określenie ich aktywności *in vivo* w modelu bólu ostrego. Hybrydyzacja nie wpłynęła niekorzystnie na aktywność farmakofora opioidowego wobec receptorów opioidowych μ i δ a obecność łącznika hydrazonowego nie wpływa na aktywność hybrydy *in vivo.* Wyniki powyższych badań zaprezentowane zostały na trzech konferencjach krajowych **Z8, Z15** oraz **Z22** a także opublikowane w postaci prac oryginalnych **O4**, **O10** oraz **O16.** Natomiast, w swojej pracy badawczej w ramach współpracy naukowej z prof. Aleksandrą Olmą z Politechniki Łódzkiej, Instytutu Chemii Organicznej, uczestniczyłam w badaniach określających wpływ modyfikacji D-Ala w pozycji 2 cząsteczki deltorfiny I na wiązanie do receptorów opioidowych μ i δ. Badania wykazały, iż selektywność wobec danego typu receptora uzależniona jest od chiralności podstawnika w pozycji 2. Wyniki uzyskane dzięki powyższej współpracy zostały zaprezentowane w formie 4 plakatów na krajowych konferencjach naukowych (**Z9, Z16, Z17, Z19**) oraz stały się podstawą 2 publikacji oryginalnych (**O7** i **O11**).

W tym samym czasie, jednym z celów moich badań było również określenie proporcji aktywacji przez bifalinę oraz morfinę receptorów opioidowych zlokalizowanych w ośrodkowym oraz obwodowym układzie nerwowym w modelu bólu nowotworowego. Obserwacja ta została opublikowana w pracy oryginalnej **H6,** wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego. Istotną rolę zjawiska analgezji obwodowej w działaniu przeciwbólowym opioidów poświęciłam również pracę przeglądową **P1.** Dodatkowo, wraz z zespołem

badawczym prof. Lipkowskiego wykazałam, że mechanizm preferencyjnej aktywacji obwodowych receptorów opioidowych przez bifalinę związany jest z jej ograniczonym przenikaniem przez barierę krew-mózg. W celu potwierdzenia stawianej hipotezy, przeprowadzone zostały również badania farmakologiczne na liniach myszy selekcjonowanych w kierunku wysokiej (*HA - high analgesia*) i niskiej (*LA - low analgesia*) analgezji postresowej (SSIA), charakteryzujących się zróżnicowaną przepuszczalnością bariery krew-mózg. Bifalina wywołała znacznie silniejszy ośrodkowy efekt analgetyczny u myszy linii HA o zwiększonej przepuszczalności bariery krew-mózg niż u myszy linii LA u których integralność bariery krew-mózg jest zachowana. Dodatkowo, określiłam iż przyczyną różnic w przepuszczalności bariery krew-mózg pomiędzy liniami myszy HA i LA są różnice w ekspresji białek ścisłych połączeń - okludyny i klaudyny-5. Wyniki potwierdzające stawiane hipotezy zostały zaprezentowane w postaci plakatów na konferencji krajowej (**Z5**) i zagranicznej (**Z13**) a także zostały przedstawione w publikacji **O8**.

Uczestniczyłam również w badaniach mających na celu określenie przydatności opatrunków na bazie keratyny stanowiącej swoiste rusztowanie dla komórek w ranach pochodzenia cukrzycowego. W niniejszych badaniach podjęłam się optymalizacji protokołu wywołania cukrzycy u myszy w celu stworzenia modelu rany cukrzycowej jako stan odpowiadający, tzw. "zespołowi stopy cukrzycowej" u ludzi, będącego jednym z powikłań niekontrolowanej cukrzycy. Koncepcja badań wraz z wynikami wstępnymi została zaprezentowana na konferencji krajowej w formie plakatu **Z18.**

W latach 2010-2013 wzrosło moje zainteresowanie fenomenem zróżnicowania poziomu wrażliwości myszy linii HA i LA na stres i analgetyki opioidowe. Postanowiłam więc we współpracy z dr hab. Mariuszem Sacharczukiem z Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu podjąć próby wytłumaczenia podłoża tego zjawiska. Dzięki doświadczeniu zdobytemu w zakresie technik identyfikacji SNP jakie zdobyłam podczas przygotowywania pracy magisterskiej, podjęłam się uczestnictwa w badaniach mających na celu potwierdzenie hipotezy o potencjalnej istotnej roli polimorfizmów w genach receptorów opioidowych w kształtowaniu wrażliwości na ból myszy linii HA i LA. W toku badań zidentyfikowaliśmy funkcjonalny polimorfizm C320T w genie receptora opioidowgo δ skutkujący substytucją A107V w pierwszej pętli przezbłonowej tegoż receptora. Najważniejszą poczynioną obserwacją było udowodnienie, iż myszy linii HA o genotypie heterozygotycznym wykazywały mniejszą wrażliwość na bodźce bólowe a także były mniej wrażliwe na przeciwbólowe działanie selektywnego agonisty receptora δ - SNC80. Dodatkowo, u myszy o genotypie CT u których wywołano SSIA, obserwowano mniejszą efektywność działania

antagonisty receptora δ - naltrindolu w porównaniu z osobnikami o genotypie CC. Otrzymane wyniki badań opublikowane zostały w pracy oryginalnej **O2.** W ramach prowadzonych badań w kierunku wyjaśnienia różnic we wrażliwości na stres i bodźce bólowe pomiędzy myszami linii HA i LA, uczestniczyłam w analizie polimorfizmów sekwencji mikrosatelitarnych. W przeprowadzonych badaniach, zidentyfikowano 32 markery mikrosatelitarne o istotnym wpływie na wartość badanych cech związanych z nasileniem SSIA. Zidentyfikowano również 7 SNP w genie Adra2c, które mogą stanowić podłoże różnic między liniami HA i LA. Wyniki opisywanej analizy przedstawione zostały na międzynarodowej konferencji krajowej w formie plakatu **Z24.** Brałam również udział w określeniu wpływu hormonów płci na poziom analgezji postresowej oraz zaangażowanie endogennych opioidów oraz innych nieopioidowych mechanizmów w to zjawisko. Z powyższych badań wynika, iż u samic analgezja postresowa angażuje odmienne mechanizmy niż aktywacja endogennych układów: opioidowego i NMDA. Wyniki wspomnianych badań zostały zaprezentowane na konferencji **Z21**.

Bazując na wynikach wcześniejszych badań wskazujących na potencjalny związek pomiędzy stosowaniem opioidów a progresją chorób nowotworowych, postanowiłam włączyć się w badania dotyczące wpływu endogennej aktywności układu opioidowego na progresję nowotworu oraz wrażliwość na ból nowotworowy. W owych badaniach wykazano, iż u myszy linii HA charakteryzujących się nadaktywnością układu opioidowego następuje wyjątkowo szybki wzrost implantowanych komórek czerniaka linii B16F0, podczas gdy u myszy linii LA, u których występuje hipoaktywność układu opioidowego, guzy albo nie wykształcały się lub ulegały spontanicznej regresji. Dodatkowo, wysoki poziom aktywności układu opioidowego sprzyja ustąpieniu hiperalgezji na termiczny bodziec bólowy. Poczynione obserwacje potwierdzają więc istotną rolę endogennego układu opioidowego zarówno w progresji nowotworu jak i wrażliwości na ból nowotworowy. Powyższe obserwacje zostały opublikowane w formie pracy oryginalnej (**O3**). W kolejnych badaniach uzyskane wyniki potwierdziły również istotny, niekorzystny wpływ stresu na progresję choroby nowotworowej oraz pojawienie się zaburzeń depresyjnych. Badania te zaowocowały ukazaniem się publikacji oryginalnej **O5.**

W 2012 r. zostałam laureatką grantu "PRELUDIUM" fundowanego przez Narodowego Centrum Nauki na realizację projektu pt. "Właściwości neuroprotekcyjne bifaliny w mysim modelu lekkiego, traumatycznego uszkodzenia mózgu". Projekt miał na celu określenie wpływu bifaliny na poprawę funkcji kognitywnych po urazie ośrodkowego układu nerwowego oraz określenie potencjalnych mechanizmów jej działania neuroprotekcyjnego.

Osiągnięcia naukowe będące wynikiem realizacji powyższego projektu zostały włączone w poczet przedstawionego do oceny cyklu habilitacyjnego (opisanego szczegółowo w punkcje 4). Wraz z realizacją założeń projektu, wzrosło moje zainteresowanie problematyką chorób neurodegeneracyjnych oraz możliwości terapii typowych dla tych schorzeń zaburzeń kognitywnych. Podjęłam się więc uczestnictwa w badaniach nad oceną potencjału neuroprotekcyjnego krótkich peptydów powstałych z białek strukturalnych rdzenia kręgowego w wyniku trawienia enzymatycznego. Hipoteza badawcza projektu zakładała, iż peptydy te poprzez stabilizację helikalnej, monomerycznej struktury amyloidu opóźniając tym samym tworzenie złogów spolimeryzowanego amyloidu. Najważniejszym osiągnięciem projektu było wykazanie, iż peptydy zawarte w hydrolizacie białek rdzenia kręgowego wpływają korzystnie na poprawę pamięci przestrzennej i rozpoznawczej w zwierzęcym modelu choroby Alzheimera (myszy FVB-APP^{+}). Wyniki powyższych badań zaprezentowane zostały na międzynarodowej konferencji w Kioto w formie plakatu **Z32.**

<u>b) działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia naukowego doktora</u>

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora w 2013 r. kontynuowałam prace nad oceną aktywności biologicznej analogów endogennych peptydów opioidowych. W ramach współpracy z Zakładem Chemii Organicznej Uniwersytetu Vrije w Brukseli oceniałam aktywność biologiczną *in vivo* glikozylowanych pochodnych Tyr-d-Arg-Phe-Lys-NH_2 (DALDA). Efektem prac było wykazanie, iż glikozylacja prowadzi do otrzymania stabilnych związków o dobrej przepuszczalności przez błony biologiczne oraz charakteryzujących się długotrwałym efektem przeciwbólowym. Wyniki owych badań zostały opublikowane w pracy oryginalnej **O6**.

Współpraca z prof. Krzysztofem Bańkowskim w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr. OR00004208) zaowocowała dostarczeniem odpowiedzi na pytanie w jaki sposób N-końcowa guanidynylacja cyklicznych ureidopeptydów, pochodnych deltorfiny, wpływa na ich powinowactwo oraz selektywność wobec receptorów opioidowych μ i δ. Wykonana przeze mnie analiza powinowactwa receptorowego wykazała, iż w przypadku niektórych związków guanidynylacja znacząco zwiększyła powinowactwo receptorowe wobec receptorów δ, co skutkowało spadkiem selektywności badanego związku. Efekt ten może mieć potencjalne znaczenie w ograniczeniu działań niepożądanych (np. tolerancji) związanych z selektywnością wobec receptora μ a także pozwala na aktywację więcej niż 1 typu receptora opioidowego, co może skutkować korzystnym zjawiskiem synergii. Koncepcja ta została przedstawiona w pracy oryginalnej **O9** a także stanowiła

podstawę zgłoszenia patentowego nr. 406934 (Bańkowski Krzysztof, Michalak Olga, **Leśniak Anna**, Filip Katarzyna, Izdebski Jan. "N-guanylowe pochodne cyklicznych ureidopeptydów, sposoby ich wytarzania i zastosowanie").

W 2013 r. dołączyłam do zespołu prof. Fred'a Nyberga na Wydziale Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Biomedycznego w Uppsali (Szwecja) w ramach stażu podoktorskiego. Moim pierwszym zadaniem badawczym była walidacja mysiego modelu bólu neuropatycznego w wyniku ciasnego podwiązania 2 gałęzi nerwu kulszowego oraz określenie poziomu ekspresji 3 typów receptorów opioidowych w rogach tylnych rdzenia kręgowego. Wykazany brak zmian w poziomie mRNA oraz gęstości receptorów opioidowych sugeruje, iż agoniści receptorów opioidowych mogą wykazywać aktywność przeciwbólową w pewnych typach bólu neuropatycznego np. związanych z mechanicznym uszkodzeniem nerwu kulszowego. Hipoteza ta została przedstawiona na konferencji zagranicznej w postaci prezentacji ustnej **Z29.**

Rozpoczęłam również badania nad potencjalnym zastosowaniem analogów N-końcowego fragmentu substancji P (SP_{1-7}) jako nowych leków przeciw bólowi neuropatycznemu. W badaniach tych wykazałam, iż aktywność anty-allodyniczna badanych peptydów po podaniu obwodowym w mysim modelu bólu neuropatycznego, uzależniona jest od N-końcowej reszty aminokwasowej Arg oraz C-końcowej reszty aminokwasowej Phe. Wyniki powyższych badań zostały opisane w publikacji oryginalnej **O18**. Uczestniczyłam również w określeniu aktywności biologicznej nowego peptydu - analogu SP_{1-7} i endomorfiny - 2 (EM-2). Najważniejszym osiągnięciem wspomnianych badań było wykazanie, iż efektywna dawka badanego peptydu niezbędna do uzyskania istotnego efektu przeciwbólowego była ponad 1000-razy niższa w porównaniu ze związkiem referencyjnym - gabapentyną. Obserwacja ta została zawarta w publikacji **O23.**

Jednym z moich kolejnych wyzwań badawczych realizowanych w ramach stażu podoktorskiego dotyczyło próby identyfikacji mechanizmu preferencyjnej kumulacji D-deprenylu (DDE) w tkankach zmienionych zapalnie. Podjęłam więc próbę poszukiwania jak dotąd nigdzie nie opisywanego celu molekularnego dla DDE poprzez zastosowanie technik sekwencjonowania o wysokiej przepustowości oraz analizy radioizotopowej w błonie maziowej pochodzącej od pacjentów cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów. W trakcie moich badań przeanalizowałam aktywność DDE wobec 165 białek z rodziny GPCR oraz 84 enzymy mogące stanowić potencjalne cele molekularne. Największym osiągnięciem było zidentyfikowanie 3 potencjalnych miejsc wiązania DDE: monoaminooksydazy typu B (MAO-B), enzymu konwertazy angiotensyny (ACE) oraz receptora histaminowego typu 1

(HRH1), które to wyniki zostały opisane w publikacji **O15.** Późniejsze badania pozwoliły na biochemiczne scharakteryzowanie nieznanego miejsca wiązania dla DDE w błonie maziowej objętej sanem zapalnym. W badaniach tych opracowałam metodykę przeprowadzenia homogenizacji próbek oraz zoptymalizowałam metodę wiązania radioizotopowego z użyciem [^{3}H]D-deprenylu ([^{3}H]DDE) jako znacznika. Powyższe badania pozwoliły na ustalenie, iż cel molekularny dla DDE stanowi najprawdopodobniej białko związane ze strukturą błony komórkowej a powinowactwo [^{3}H]DDE wzrasta wraz z nasileniem stanu zapalnego. Jednakże nie udało się jednoznacznie ustalić czy enzym MAO-B (białko zewnętrznej błony mitochondrialnej) stanowi marker stanu zapalnego a jednocześnie główny cel wiązania dla [^{3}H]DDE. Powyższe obserwacje opublikowane zostały w formie publikacji oryginalnej **O21** a także zostały zaprezentowane na zagranicznej konferencji naukowej w formie plakatu **Z33.**

Podczas odbywania stażu podoktorskiego nawiązałam również współpracę z Zakładem Farmakodynamiki Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach oceny powinowactwa związku AA3052 - DALDA(chimery DALDA - substancja P) do receptorów opioidowych typu μ. Wyniki moich badań w tym kierunku zaowocowały publikacją **O14** jak również zostały zaprezentowane w formie plakatu **Z25** na międzynarodowej konferencji krajowej. W 2017 r. wyniki te zostały nagrodzone nagrodą **N5**.

Po zakończeniu badań w ramach stażu podoktorskiego, rozpoczęłam w 2016 r. pracę na stanowisku adiunkta w Zakładzie Farmakodynamiki (obecnie Zakład Farmakodynamiki i Patofizjologii) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. W ramach swojej pracy badawczej, aktywnie uczestniczyłam w realizacji trwających w Zakładzie projektów badawczych mających na celu określenie roli inhibitorów tlenku azotu (NO) na działanie przeciwbólowe tapentadolu, przydatności stosowania jednoczesnego podania antagonistów NMDA i receptora histaminowego H_4 a także zastosowania związków hybrydowych opioid-neurotensyna w terapii bólu ostrego. Powyższe badania potwierdziły korzystny wpływ zahamowania syntezy NO na efekt przeciwbólowy tapentadolu a także udowodniły istotną rolę receptorów NMDA i H_4 w modulacji odpowiedzi bólowej w bólu pochodzenia niezapalnego. Wyniki opisanych powyżej badań opublikowane zostały jako prace oryginalne **O12** i **O19** oraz jako doniesienie zjazdowe **Z28** na konferencji krajowej. Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań *in vivo* udało się określić, iż hybrydyzacja farmakofora opioidowego oraz neurotensynowego w jedną cząsteczkę o nazwie roboczej [Ile(9)]PK20, jest strategią obniżającą aktywność przeciwbólową związku. Zjawisko to, opisane zostało w pracy oryginalnej **O13.**

Korzystając z doświadczenia zdobytego podczas stażu doktorskiego w zakresie analizy efektywności nowych związków w modelach bólu neuropatycznego, podjęłam się uczestnictwa w badaniach określających przeciwbólowy wpływ ekstraktu z liści *Ligustrum vulgare* w modelu polineuropatii cukrzycowej. Najważniejszym wynikiem otrzymanym w toku badań była obserwacja, iż irydoidy oraz flawoniody zawarte w wodnym ekstrakcie wykazują działanie anty-allodyniczne, niezwiązane z działaniem hipoglikemicznym. Wyniki powyższych obserwacji opublikowane zostały w pracy oryginalnej **O20.**

Postanowiłam również kontynuować badania nad wyjaśnieniem różnic pomiędzy myszami HA i LA, tym razem w aspekcie podatności na uzależnienie od alkoholu. Najistotniejszą obserwacją poczynioną w toku badań, było wykazanie, iż farmakologiczne zablokowanie receptora opioidowego δ jak również niska, endogenna aktywność układu opioidowego, sprzyja rozwojowi uzależnienia od alkoholu. Odkrycie to opublikowane zostało jako praca oryginalna **O17** oraz zostało nagrodzone nagrodą **N6.** Ponadto określiliśmy, iż zwiększenie przepuszczalności bariery krew-mózg hamuje spożycie oraz preferencję alkoholu hamując tym samym rozwój uzależnienia. Badania w tym kierunku zostały nagrodzone nagrodą **N7.** Opis problematyki uzależnienia od alkoholu została omówiona dodatkowo w pracy przeglądowej **P2.**

W 2018 r. byłam inicjatorką nowej koncepcji badawczej wskazującej na obniżenie poziomu neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) wskutek rozszczelnienia bariery krew-mózg, jako nowego mechanizmu etiologii zaburzeń depresyjnych. Koncepcja ta została zaprezentowana na międzynarodowej konferencji krajowej w postaci plakatu **Z26.** Tematyka badań stanowiła również podstawę 1 pracy magisterskiej, w której pełniłam rolę promotora. Praca ta zajęła IV miejsce oraz nagrodę publiczności na 55 Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Moją dodatkową działalność badawczą stanowią badania określające przeciwdepresyjną aktywność ligandów receptorów 5-HT_1 i 5-HT_2 w ramach współpracy z Zakładem Chemii Organicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. W ramach wyżej wymienionej współpracy powstała publikacja oryginalna **O22.**

6. Pozostałe publikacje oryginalne

O1 Lesniak A [autor koresp.], Walczak M, Jezierski T, Sacharczuk M, Gawkowski M, Jaszczak K. Canine olfactory receptor gene polymorphism and its relation to odor detection performance by sniffer dogs. The Journal of Heredity. 2008;99(5):518-27.

O2 Sacharczuk M, **Lesniak A**, Korostynski M, Przewlocki R, Lipkowski A, Jaszczak K, Sadowski B. A polymorphism in exon 2 of the delta-opioid receptor affects nociception in response to specific agonists and antagonists in mice selectively bred for high and low analgesia. Pain. 2010;149(3):506-13.

O3 Sacharczuk M, Ragan AR, Szymanska H, **Lesniak A**, Sadowski B, Lipkowski AW. Distinct susceptibility to inoculated melanoma and sensitivity to cancer pain in mouse lines with high and low sensitivity to stress. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology. 2012;31(2):167-77.

O4 Matalinska J, Skurzak H, Markowicz S, **Lesniak A**, Sacharczuk M, Molnar G, Varga E, Lipkowski AW. Opioid agonist--tachykinin antagonist as a new analgesic with adjuvant anticancer properties. Folia Neuropathologica. 2013;51(2):132-9.

O5 Ragan AR, **Lesniak A**, Bochynska-Czyz M, Kosson A, Szymanska H, Pysniak K, Gajewska M, Lipkowski AW, Sacharczuk M. Chronic mild stress facilitates melanoma tumor growth in mouse lines selected for high and low stress-induced analgesia. Stress. 2013 Sep;16(5):571-80.

O6 Ballet S, Betti C, Novoa A, Tomboly C, Nielsen CU, Helms HC, **Lesniak A**, Kleczkowska P, Chung NN, Lipkowski AW, Brodin B, Tourwe D, Schiller PW. In Vitro Membrane Permeation Studies and in Vivo Antinociception of Glycosylated Dmt(1)-DALDA Analogues. ACS Med Chem Lett. 2014 Apr 10;5(4):352-7.

O7 Fraczak O, Lasota A, **Lesniak A**, Lipkowski AW, Olma A. The biological consequences of replacing D-Ala in biphalin with amphiphilic alpha-alkylserines. Chem Biol Drug Des. 2014 Aug;84(2):199-205.

O8 Kosson A, Krizbai I, **Lesniak A**, Beresewicz M, Sacharczuk M, Kosson P, Nagyoszi P, Wilhelm I, Kleczkowska P, Lipkowski AW. Role of the blood-brain barrier in differential response to opioid peptides and morphine in mouse lines divergently bred for high and low swim stress-induced analgesia. Acta Neurobiologiae Experimentalis. 2014;74(1):26-32.

O9 Bankowski K, Michalak OM, **Lesniak A**, Filip KE, Cmoch P, Szewczuk Z, Stefanowicz P, Izdebski J. N-terminal guanidinylation of the cyclic 1,4-ureido-deltorphin analogues: the synthesis, receptor binding studies, and resistance to proteolytic digestion. J Pept Sci. 2015 Jun;21(6):467-75.

O10 Guillemyn K, Kleczkowska P, **Lesniak A**, Dyniewicz J, Van der Poorten O, Van den Eynde I, Keresztes A, Varga E, Lai J, Porreca F, Chung NN, Lemieux C, Mika J, Rojewska E, Makuch W, Van Duppen J, Przewlocka B, Vanden Broeck J, Lipkowski AW, Schiller PW, Tourwe D, Ballet

S. Synthesis and biological evaluation of compact, conformationally constrained bifunctional opioid agonist - neurokinin-1 antagonist peptidomimetics. Eur J Med Chem. 2015 Mar 6;92:64-77.

O11 Lasota A, Fraczak O, **Lesniak A**, Muchowska A, Lipkowski AW, Nowakowski M, Ejchart A, Olma A. Analogues of deltorphin I containing conformationally restricted amino acids in position 2: structure and opioid activity. J Pept Sci. 2015 Feb;21(2):120-5.

O12 Bujalska-Zadrozny M, Wolinska R, **Lesniak A**, Sacharczuk M. Central antinociceptive effect of tapentadol is increased by nitric oxide synthase inhibitors. Behav Pharmacol. 2016 Oct;27(7):606-14.

O13 Kleczkowska P, Hermans E, Kosson P, Kowalczyk A, **Lesniak A**, Pawlik K, Bojnik E, Benyhe S, Nowicka B, Bujalska-Zadrozny M, Misicka A, Lipkowski AW. Antinociceptive effect induced by a combination of opioid and neurotensin moieties vs. their hybrid peptide [Ile(9)]PK20 in an acute pain treatment in rodents. Brain Res. 2016 Oct 1;1648(Pt A):172-80.

O14 Kowalczyk A, Kleczkowska P, Rekawek M, Kulik K, **Lesniak A**, Erdei A, Borics A, Martin C, Pawlik K, Lipkowski AW, Benyhe S, Makulska-Nowak H, Ballet S, Bujalska-Zadrozny M. Biological evaluation and molecular docking studies of AA3052, a compound containing a mu-selective opioid peptide agonist DALDA and d-Phe-Phe-d-Phe-Leu-Leu-NH2, a substance P analogue. Eur J Pharm Sci. 2016 Oct 10;93:11-20.

O15 Lesniak A [pierwszy autor], Aarnio M, Jonsson A, Norberg T, Nyberg F, Gordh T. High-throughput screening and radioligand binding studies reveal monoamine oxidase-B as the primary binding target for d-deprenyl. Life Sci. 2016 May 1;152:231-7.

O16 Dyniewicz J, Lipinski PF, Kosson P, **Lesniak A**, Bochynska-Czyz M, Muchowska A, Tourwe D, Ballet S, Misicka A, Lipkowski AW. Hydrazone Linker as a Useful Tool for Preparing Chimeric Peptide/Nonpeptide Bifunctional Compounds. ACS Med Chem Lett. 2017 Jan 12;8(1):73-7.

O17 Poznanski P, **Lesniak A**, Korostynski M, Szklarczyk K, Lazarczyk M, Religa P, Bujalska-Zadrozny M, Sadowski B, Sacharczuk M. Delta-opioid receptor antagonism leads to excessive ethanol consumption in mice with enhanced activity of the endogenous opioid system. Neuropharmacology. 2017 May 15;118:90-101.

O18 Skogh A, **Lesniak A**, Gaugaz FZ, Svensson R, Lindeberg G, Fransson R, Nyberg F, Hallberg M, Sandstrom A. Impact of N-methylation of the substance P 1-7 amide on anti-allodynic effect in mice after peripheral administration. Eur J Pharm Sci. 2017 Nov 15;109:533-40.

O19 Wolinska R, **Lesniak A**, Zochowska M, Sacharczuk M, Kiec-Kononowicz K, Bujalska-Zadrozny M. Antinociceptive effect of co-administered NMDA and histamine H4 receptor antagonists in a rat model of acute pain. Pharmacol Rep. 2017 Apr;69(2):222-8.

O20 Czerwinska ME, Gasinska E, **Lesniak A**, Krawczyk P, Kiss AK, Naruszewicz M, Bujalska-Zadrozny M. Inhibitory effect of *Ligustrum vulgare* leaf extract on the development of

neuropathic pain in a streptozotocin-induced rat model of diabetes. Phytomedicine. 2018 Oct 1;49:75-82.

O21 Lesniak A [pierwszy autor], Aarnio M, Diwakarla S, Norberg T, Nyberg F, Gordh T. Characterization of the binding site for d-deprenyl in human inflamed synovial membrane. Life Sci. 2018 Feb 1;194:26-33.

O22 Ostrowska K, Grzeszczuk D, Gluch-Lutwin M, Grybos A, Siwek A, **Lesniak A**, Sacharczuk M, Trzaskowski B. 5-HT1A and 5-HT2A receptors affinity, docking studies and pharmacological evaluation of a series of 8-acetyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin derivatives. Bioorg Med Chem. 2018 Jan 15;26(2):527-35.

O23 Skogh A, **Lesniak A [pierwszy autor ex aequo]**, Skold C, Karlgren M, Gaugaz FZ, Svensson R, Diwakarla S, Jonsson A, Fransson R, Nyberg F, Hallberg M, Sandstrom A. An imidazole based H-Phe-Phe-NH2 peptidomimetic with anti-allodynic effect in spared nerve injury mice. Bioorg Med Chem Lett. 2018 Aug 1;28(14):2446-50.

7. Pozostałe publikacje przeglądowe

P1 Lesniak A [pierwszy autor], Lipkowski AW. Opioid peptides in peripheral pain control. Acta Neurobiologiae Experimentalis. 2011;71(1):129-38.

P2 Poznański P, **Leśniak A**, Strzemecka J, Sacharczuk M. Review of research on alcohol dependence in a model of mice selected for high and low stress-induced analgesia. . Health Prob Civil. 2018;12(3):217-222.

8. Doniesienia zjazdowe

Z1 Lipkowski AW, Matyja E, Szaniawska B, Lazarkiewicz A, Kosson P, Klinowiecka, **Lesniak A**, Janiszewska J, Kurzepa K. Neuropeptide analogues as prospective adjuvants of cancer pain treatment. 20th Polish Peptide Symposium, Władysławowo, 6-10.2009 37.

Z2 Lesniak A, Kosson P, Rafałowska J, Gadamski R, Lipkowski AW. Assessment of analgesic potency of an opioid peptide analogue biphalin in a mouse model of neuropathic pain. 20th Polish Peptide Symposium, Władysławowo, 6-10.2009 120.

Z3 Leśniak A, Sacharczuk M, Kosson P, Rafałowska J, Gadamski R, Lipkowski AW. Assessment of analgesic potency of biphalin in a mouse model of cancer pain. VII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku. Zakopane, 10-12.05.2010 63.

Z4 Sowinska M, **Leśniak A**, Lipkowski AW, Lipkowska Z. Dendrimeric peptides with affinity to opioid receptors – complexation properties. VII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku. Zakopane, 10-12.05.2010 35.

Z5 Klinowiecka A, Kosson P, **Lesniak A**, Sacharczuk M, Sadowski B, Lipkowski AW. Comparable antinociceptive effect of biphalin in mice selected for high and low swim stress-induced analgesia after blood-brain barrier disruption caused by hyperosmolar mannitol administration. VII Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku. Zakopane, 10-12.05.2010 47.

Z6 Lesniak A, Matalinska J, Bochyńska-Czyż M, Sacharczuk M, Kosson P, Lipkowski AW. Peripheral and central analgesic effects of novel opioid peptides. European Opioid Conference, Kraków 13-15.04.2011 223.

Z7 Lesniak A, Matalinska J, Bochynska-Czyz M, Sacharczuk M, Lipkowski AW, Peripheral and central analgesic effects of novel opioid peptides. XXI Polish Peptide Symposium, Supraśl, 4-8.09.2011.

Z8 Dyniewicz J, Bochynska-Czyz M, **Lesniak A**, Ostrowski S, Dobrowolski J, Lipkowski AW. Synthesis and biological activity of peptides with both, opioid agonist and tachykinin antagonist components. XXI Polish Peptide Symposium, Supraśl, 4-8.09.2011 75.

Z9 Fraczak O, Lasota A, Podwysocka D, Olma A, **Lesniak A**, Lipkowski AW. Analogues of biphalin containing β^3 – homo-amino acids. XXI Polish Peptide Symposium, Supraśl, 4-8.09.2011 77.

Z10 Lasota A, Olma A, **Lesniak A**, Lipkowski AW. Analogues of deltorphin I containing α-methyl-β-azido(amino)alanine in position 2. XXI Polish Peptide Symposium, Supraśl, 4-8.09.2011 104.

Z11 Lesniak A, Bochyńska-Czyz M, Sacharczuk M, Benhye S, Lipkowski AW. Dimeryczne peptydy opioidowe – skuteczne analgetyki w walce z bólem nowotworowym. VI Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, 13-15.06.2012 80.

Z12 Lesniak A, Bochynska-Czyz M, Sacharczuk M, Lipkowski, AW. Comparison of peripheral and central antinociceptive effects of biphalin and morphine in a mouse model of cancer pain. International Narcotics Research Conference, Kansas City, USA, 15-20.08.2012 51.

Z13 Lipkowski AW, Kosson A, **Lesniak A**, Sacharczuk M, Tóth G, Molnár J, Krizbai IA, Wilhelmi I. Sadowski mouse strains of high and low stress-induced analgesia as a model of blood brain barrier permeability studies of opioid peptides and alkaloids. International Narcotics Research Conference, Kansas City, USA, 15-20.08.2012 54.

Z14 Lesniak A, Marta Bochynska-Czyz M, Mariusz Sacharczuk M, Lipkowski AW. Biphalin - a dimeric enkephalin analogue produces stronger peripheral analgesia than morphine in a mouse model of cancer pain. 22nd Polish Peptide Symposium, Kudowa-Zdrój, 1-5.09.2013 106.

Z15 Dyniewicz J, **Lesniak A**, Bochynska-Czyz M, Nowicka B, Lipkowski AW. New bifunctional peptides that hybridize opioid agonist with substance P. 22nd Polish Peptide Symposium, Kudowa-Zdrój, 1-5.09.2013 73.

Z16 Fraczak O, Olma A, **Lesniak A**, Lipkowski AW. O-Acyl Isopeptide method for the efficient synthesis of new biphalin analogues. 22nd Polish Peptide Symposium, Kudowa-Zdrój, 1-5.09.2013 77.

Z17 Jagiełło J, Fraczak O, Olma A, **Leśniak A**, Lipkowski AW. Synthesis of 4-anilidopiperidine analogues of [MeSer^2]enkephalins. 22nd Polish Peptide Symposium, Kudowa-Zdrój, 1-5.09.2013 86.

Z18 Konop M, **Leśniak A**, Kosson P, Bochynska-Czyz M, Rudnicka L, Lipkowski AW. Keratin-associated protein micromaterials as scaffolds for wound healing in mouse diabetic animal model. 22nd Polish Peptide Symposium, Kudowa-Zdrój, 1-5.09.2013 99.

Z19 Lasota A, Olma A, **Leśniak A**, Lipkowski AW. Design and synthesis of deltorphin I and dermorphin analogues containing amphiphilic amino acids in position 2. 22nd Polish Peptide Symposium, Kudowa-Zdrój, 1-5.09.2013 104.

Z20 **Lesniak A**, Sacharczuk M, Pick CG, Lipkowski AW. Neuroprotective effect of biphalin in a mouse model of mild traumatic brain injury (mTBI). IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Korytnica k/Szydłowa, 12 - 14.05.2014 46.

Z21 Sacharczuk M, **Lesniak A**, Ragan AR, Korostynski M, Przewlocki R, Sadowski B, Lipkowski AW. Sex differences in the opioid component of swim stress-induced analgesia in mouse lines selected for high or low sensitivity to stress. IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Korytnica k/Szydłowa, 12 - 14.05.2014 62.

Z22 Dyniewicz J, **Lesniak A**, Bochynska-Czyz M, Nowicka B, Kosson P, Ballet S, Lipkowski AW. New analgesics with adjuvant anticancer properties. IX Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, Korytnica k/Szydłowa, 12 - 14.05.2014 15.

Z23 **Lesniak A**, Starzynski RR, Bujalska-Zadrożny M, Lipkowski AW, Sacharczuk M. Endogenous opioid system activity determines the severity of memory impairments after mild traumatic brain injury (mTBI) in mice selected for high (HA) and low (LA) swim stress-induced analgesia. 2nd Central European Biomedical Congress, Kraków, 15-18.06.2016 104.

Z24 Fedorowicz K, Lapo I, Konarzewski M, Kawka M, Jaszczak K, **Lesniak A**, Bujalska-Zadrozny M, Sadowski B, Sacharczuk M. Mapping of metabolism, thermoregulation and analgesia QTLs in a cross between mouse lines divergently selected for high and low swim stress-induced analgesia. 2nd Central European Biomedical Congress, Kraków, 15-18.06.2016 97.

Z25 Kowalczyk A, Kleczkowska P, Kulik K, Rękawek M, **Lesniak A**, Erdei A, Benyhe S, Borics A, Lipkowski AW, Martin C, Makulska-Nowak H, Ballet S, Bujalska-Zadrozny M. AA3052, and opioid and neurokinin-1 receptors structurally related hybrid peptide exerts antinociceptive effects with lack of development of tolerance during its intracerebroventricular injection. 2nd Central European Biomedical Congress, Kraków, 15-18.06.2016 111.

Z26 **Lesniak A**, Sacharczuk M, Wojciechowska D, Bujalska-Zadrozny M. Mice selected for high (HA) and low (LA) swim stress-induced analgesia (SSIA) show divergent cannabinoid system activity. XI Copernican International Young Scientists Conference, Toruń 28 - 30. 06. 2017 111.

Z27 Lesniak A, Wilk K, Poznański P, Bujalska-Zadrożny M, Sacharczuk M. Depressive-like behavior is related to blood-brain barrier dysfunction and BDNF leakage. 3rd Central European Biomedical Congress, Kraków, 15-18.09.2018 83.

Z28 Wolińska R, Kleczkowska P, **Leśniak A**, Bujalska-Zadrożny M. Nitric oxide synthase and tapentadol analgesia - from the opioidergic and noradrenergic perspective. XI Copernican International Young Scientists Conference, Toruń 28 - 30. 06. 2017 110.

Z29 Jonsson A, Gronbladh A, **Lesniak A**, Hallberg M, Nyberg F. Opioid receptor expression in mice with persistent, long-term neuropathic pain. International Narcotics Research Conference, Montreal, Kanada 13-18. 07. 2014 50.

Z30 Lesniak A, Sacharczuk M, Pick CG, Lipkowski AW. Neuroprotective effects of biphalin in a mouse model of mild traumatic brain injury (mTBI). International Narcotics Research Conference, Montreal, Kanada 13-18. 07. 2014 49.

Z31 Lesniak A, Sacharczuk M, Pick CG, Lipkowski AW. Biphalin protects against cognitive deficits in a mouse model of mild traumatic brain injury (mTBI). 20th International Symposium on Regulatory Peptides, Kioto, Japonia, 7-10.09.2014 S151.

Z32 Sacharczuk A , Slupska M, Kurzepa K, **Lesniak A**, Rozycki K, Misicka A, Lipkowski AW. Minichaperon peptides generated from neuronal proteins. 20th International Symposium on Regulatory Peptides, Kioto, Japonia, 7-10.09.2014 S152.

Z33 Lesniak A, Aarnio M, Jonsson A, Norberg T, Nyberg F, Gordh T. High-throughput screening and receptor binding reveal enzyme and GPCR targets as binding sites for a new PET tracer - D-deprenyl. Society for Neuroscience, Chicago, USA, 17-21.11. 2015 828.01.

Z34 Lesniak A, Sacharczuk M, Wojciechowska M, Bujalska-Zadrozny M. Divergent cannabinoid system activity in high (HA) and low (LA) opioid sensitivity mouse lines – evidence for a common pathway. 5th Annual International Conference on Pharmaceutical Sciences, Ateny, Grecja, 7-10.05. 2018 39.

9. Nagrody i wyróżnienia

N1 I nagroda Polskiego Towarzystwa Genetycznego (PTG) za najlepszą pracę opublikowaną w 2008 r. pt. „Canine Olfactory Receptor Gene Polymorphism and its Relation to Odor Detection Performance by Sniffer Dogs" Lesniak A., Walczak M., Jezierski T., Sacharczuk M., Gawkowski M., Jaszczak K. 2008. J. Heredity. 99:518–527.

N2 Złoty medal oraz nagroda Mołdawskiej Agencji Własności Intelektualnej (AGEPI) na targach Grand Prix Brussels Innova 2012r. za prezentację wynalazku: „New peptidomimetics reduce side effects of oral morphine". Autorzy: Andrzej W. Lipkowski, Anna Leśniak, Krzysztof Różycki.

N3 Nagroda Dyrektora Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu za publikację: Sacharczuk M, Lesniak A, Lipkowski AW, Korostynski M, Przewlocki R, Sadowski B.

„Association between the A107V substitution in the δ-opioid receptors and ethanol drinking in mice selected for high and low analgesia." Addiction Biology. 2014;19(4):643-651.

N4 Nagroda Dyrektora Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w 2016 za najlepsze prace opublikowane w czasopismach o 5-letnim współczynniku oddziaływania IF > 3.5 za publikację „Biphalin protects against cognitive deficits in a mouse model of mild traumatic brain injury (mTBI) autorstwa Lesniak A, Pick CG, Misicka A, Lipkowski AW, Sacharczuk M. Neuropharmacology. 2016 Feb;101:506-518."

N5 Nagroda Naukowa III stopnia Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w 2017 r. za współautorstwo pracy: „Biological evaluation and molecular docking studies of AA3052, a compound containing a μ - selective opioid peptide agonist DALDA and D-Phe-Phe-D-Phe-Leu-Leu-NH2, a substance P analogue". Eur J Pharm Sci. 2016 Oct 10;93:11-20.

N6 Nagroda Naukowa II stopnia Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w 2018 r. za współautorstwo publikacji dotyczącej wyjaśnienia niespecyficznego efektu naltreksonu prowadzącego do wzrostu spożycia i preferencji alkoholu w stanie nadreaktywności układu opioidowego.

N7 I miejsce w konkursie na pracę naukową organizowanym przez Polską Koalicję Medycyny Personalizowanej - Stowarzyszenie w 2019 za pracę: Poznanski P, **Lesniak A**, Korostynski M, Sacharczuk M. Ethanol consumption following mild traumatic brain injury is related to the blood-brain barrier permeability. Addiction Biology. 2018. 10.1111/adb.12683.

N8 II miejsce w konkursie na pracę naukową organizowanym przez Polską Koalicję Medycyny Personalizowanej - Stowarzyszenie w 2019 za pracę: Poznanski P, **Lesniak A**, Bujalska-Zadrozny M, Strzemecka J, Sacharczuk M. Bidirectional selection for high and low stress-induced analgesia affects G-protein activity. Neuropharmacology. 2019, 144:37-42.

Piśmiennictwo

[1] Fields HL, Margolis EB. Understanding opioid reward. Trends Neurosci. 2015, Apr;38(4):217-225.

[2] Evans CJ, Cahill CM. Neurobiology of opioid dependence in creating addiction vulnerability. F1000Res. 2016;5.

[3] Winters BL, Gregoriou GC, Kissiwaa SA, Wells OA, Medagoda DI, Hermes SM, Burford NT, Alt A, Aicher SA, Bagley EE. Endogenous opioids regulate moment-to-moment neuronal communication and excitability. Nat Commun. 2017, Mar 22;8:14611.

[4] Kang X, Chao D, Gu Q, Ding G, Wang Y, Balboni G, Lazarus LH, Xia Y. delta-Opioid receptors protect from anoxic disruption of Na+ homeostasis via Na+ channel regulation. Cell Mol Life Sci. 2009, Nov;66(21):3505-3516.

[5] Rola R, Jarkiewicz M, Szulczyk P. Modulation of Ca2+ channel current by mu opioid receptors in prefrontal cortex pyramidal neurons in rats. Acta neurobiologiae experimentalis. 2008;68(1):10-25.

[6] Faden AI, Feuerstein G. Hypothalamic regulation of the cardiovascular and respiratory systems: role of specific opiate receptors. Br J Pharmacol. 1983, Aug;79(4):997-1002.

[7] Tsagarakis S, Rees LH, Besser M, Grossman A. Opiate receptor subtype regulation of CRF-41 release from rat hypothalamus in vitro. Neuroendocrinology. 1990, May;51(5):599-605.

[8] Bilkei-Gorzo A, Racz I, Michel K, Mauer D, Zimmer A, Klingmuller D. Control of hormonal stress reactivity by the endogenous opioid system. Psychoneuroendocrinology. 2008, May;33(4):425-436.

[9] Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. Nat Genet. 2000, Jun;25(2):195-200.

[10] Kung JC, Chen TC, Shyu BC, Hsiao S, Huang AC. Anxiety- and depressive-like responses and c-fos activity in preproenkephalin knockout mice: oversensitivity hypothesis of enkephalin deficit-induced posttraumatic stress disorder. J Biomed Sci. 2010, Apr 21;17:29.

[11] Kasai S, Ikeda K. Pharmacogenomics of the human micro-opioid receptor. Pharmacogenomics. 2011, Sep;12(9):1305-1320.

[12] Mague SD, Blendy JA. OPRM1 SNP (A118G): involvement in disease development, treatment response, and animal models. Drug Alcohol Depend. 2010, May 1;108(3):172-182.

[13] Burnett FE, Scott LV, Weaver MG, Medbak SH, Dinan TG. The effect of naloxone on adrenocorticotropin and cortisol release: evidence for a reduced response in depression. J Affect Disord. 1999, Jun;53(3):263-268.

[14] Oswald LM, Mathena JR, Wand GS. Comparison of HPA axis hormonal responses to naloxone vs psychologically-induced stress. Psychoneuroendocrinology. 2004, Apr;29(3):371-388.

[15] Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW. Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. J Neurosci. 2001, Dec 1;21(23):RC184.

[16] Valenta JP, Job MO, Mangieri RA, Schier CJ, Howard EC, Gonzales RA. mu-opioid receptors in the stimulation of mesolimbic dopamine activity by ethanol and morphine in Long-Evans rats: a delayed effect of ethanol. Psychopharmacology (Berl). 2013, Aug;228(3):389-400.

[17] Gold MS, Pottash AL, Extein I, Martin DA, Finn LB, Sweeney DR, Kleber HD. Evidence for an endorphin dysfunction in methadone addicts: lack of ACTH response to naloxone. Drug Alcohol Depend. 1981, Nov;8(3):257-262.

[18] Kirtley OJ, O'Carroll RE, O'Connor RC. The role of endogenous opioids in non-suicidal self-injurious behavior: methodological challenges. Neurosci Biobehav Rev. 2015, Jan;48:186-189.

[19] Schrepf A, Harper DE, Harte SE, Wang H, Ichesco E, Hampson JP, Zubieta JK, Clauw DJ, Harris RE. Endogenous opioidergic dysregulation of pain in fibromyalgia: a PET and fMRI study. Pain. 2016, Oct;157(10):2217-2225.

[20] Johnson B, Ulberg S, Shivale S, Donaldson J, Milczarski B, Faraone SV. Fibromyalgia, autism, and opioid addiction as natural and induced disorders of the endogenous opioid hormonal system. Discov Med. 2014, Oct;18(99):209-220.

[21] Panksepp J. A neurochemical theory of autism. . Trends Neurosci 1979;2:174-177.

[22] Leboyer M, Bouvard MP, Recasens C, Philippe A, Guilloud-Bataille M, Bondoux D, Tabuteau F, Dugas M, Panksepp J, Launay JM, et al. Difference between plasma N- and C-terminally directed beta-endorphin immunoreactivity in infantile autism. Am J Psychiatry. 1994, Dec;151(12):1797-1801.

[23] Jang CG, Lee SY, Yoo JH, Yan JJ, Song DK, Loh HH, Ho IK. Impaired water maze learning performance in mu-opioid receptor knockout mice. Brain Res Mol Brain Res. 2003, Sep 10;117(1):68-72.

[24] Meilandt WJ, Barea-Rodriguez E, Harvey SA, Martinez JL, Jr. Role of hippocampal CA3 mu-opioid receptors in spatial learning and memory. J Neurosci. 2004, Mar 24;24(12):2953-2962.

[25] Mathieu-Kia AM, Fan LQ, Kreek MJ, Simon EJ, Hiller JM. Mu-, delta- and kappa-opioid receptor populations are differentially altered in distinct areas of postmortem brains of Alzheimer's disease patients. Brain Res. 2001, Mar 2;893(1-2):121-134.

[26] Rinne JO, Lonnberg P, Marjamaki P, Molsa P, Sako E, Paljarvi L. Brain methionine- and leucine-enkephalin receptors in patients with dementia. Neurosci Lett. 1993, Oct 14;161(1):77-80.

[27] Skandsen T, Einarsen CE, Normann I, Bjoralt S, Karlsen RH, McDonagh D, Nilsen TL, Akslen AN, Haberg AK, Vik A. The epidemiology of mild traumatic brain injury: the Trondheim MTBI follow-up study. Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2018, Apr 27;26(1):34.

[28] O'Neil ME, Carlson K, Storzbach D, Brenner L, Freeman M, Quinones A, Motu'apuaka M, Ensley M, Kansagara D. 2013, Jan A Systematic Review.

[29] Marshall S, Bayley M, McCullagh S, Velikonja D, Berrigan L, Ouchterlony D, Weegar K. Updated clinical practice guidelines for concussion/mild traumatic brain injury and persistent symptoms. Brain Inj. 2015;29(6):688-700.

[30] McInnes K, Friesen CL, MacKenzie DE, Westwood DA, Boe SG. Mild Traumatic Brain Injury (mTBI) and chronic cognitive impairment: A scoping review. PLoS One. 2017;12(4):e0174847.

[31] Lee B, Newberg A. Neuroimaging in traumatic brain imaging. NeuroRx. 2005, Apr;2(2):372-383.

[32] McDonald BC, Saykin AJ, McAllister TW. Functional MRI of mild traumatic brain injury (mTBI): progress and perspectives from the first decade of studies. Brain Imaging Behav. 2012, Jun;6(2):193-207.

[33] Oehr L, Anderson J. Diffusion-Tensor Imaging Findings and Cognitive Function Following Hospitalized Mixed-Mechanism Mild Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. Arch Phys Med Rehabil. 2017, Nov;98(11):2308-2319.

[34] Lagerstedt L, Egea-Guerrero JJ, Bustamante A, Rodriguez-Rodriguez A, El Rahal A, Quintana-Diaz M, Garcia-Armengol R, Prica CM, Andereggen E, Rinaldi L, Sarrafzadeh A, Schaller K, Montaner J, Sanchez JC. Combining H-FABP and GFAP increases the capacity to differentiate between CT-positive and CT-negative patients with mild traumatic brain injury. PLoS One. 2018;13(7):e0200394.

[35] Selassie AW, Wilson DA, Pickelsimer EE, Voronca DC, Williams NR, Edwards JC. Incidence of sport-related traumatic brain injury and risk factors of severity: a population-based epidemiologic study. Ann Epidemiol. 2013, Dec;23(12):750-756.

[36] Lindquist LK, Love HC, Elbogen EB. Traumatic Brain Injury in Iraq and Afghanistan Veterans: New Results From a National Random Sample Study. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2017, Summer;29(3):254-259.

[37] Seal KH, Bertenthal D, Barnes DE, Byers AL, Strigo I, Yaffe K. Association of Traumatic Brain Injury With Chronic Pain in Iraq and Afghanistan Veterans: Effect of Comorbid Mental Health Conditions. Arch Phys Med Rehabil. 2017, Aug;98(8):1636-1645.

[38] Seal KH, Bertenthal D, Barnes DE, Byers AL, Gibson CJ, Rife TL, Yaffe K. Traumatic Brain Injury and Receipt of Prescription Opioid Therapy for Chronic Pain in Iraq and Afghanistan Veterans: Do Clinical Practice Guidelines Matter? J Pain. 2018, Aug;19(8):931-941.

[39] van den Beuken-van Everdingen MH, de Rijke JM, Kessels AG, Schouten HC, van Kleef M, Patijn J. Prevalence of pain in patients with cancer: a systematic review of the past 40 years. Ann Oncol. 2007, Sep;18(9):1437-1449.

[40] Thienthong S, Pratheepawanit N, Limwattananon C, Maoleekoonpairoj S, Lertsanguansinchai P, Chanvej L. Pain and quality of life of cancer patients: a multi-center study in Thailand. J Med Assoc Thai. 2006, Aug;89(8):1120-1126.

[41] McNicol E, Horowicz-Mehler N, Fisk RA, Bennett K, Gialeli-Goudas M, Chew PW, Lau J, Carr D. Management of opioid side effects in cancer-related and chronic noncancer pain: a systematic review. J Pain. 2003, Jun;4(5):231-256.

[42] Perrot S, Guilbaud G, Kayser V. Differential behavioral effects of peripheral and systemic morphine and naloxone in a rat model of repeated acute inflammation. Anesthesiology. 2001, May;94(5):870-875.

[43] Stein C, Comisel K, Haimerl E, Yassouridis A, Lehrberger K, Herz A, Peter K. Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. N Engl J Med. 1991, Oct 17;325(16):1123-1126.

[44] Menendez L, Lastra A, Meana A, Hidalgo A, Baamonde A. Analgesic effects of loperamide in bone cancer pain in mice. Pharmacol Biochem Behav. 2005, May;81(1):114-121.

[45] Baamonde A, Lastra A, Juarez L, Garcia V, Hidalgo A, Menendez L. Effects of the local administration of selective mu-, delta-and kappa-opioid receptor agonists on osteosarcoma-induced hyperalgesia. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2005, Nov;372(3):213-219.

[46] Truong W, Cheng C, Xu QG, Li XQ, Zochodne DW. Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. Ann Neurol. 2003, Mar;53(3):366-375.

[47] Schafer M, Imai Y, Uhl GR, Stein C. Inflammation enhances peripheral mu-opioid receptor-mediated analgesia, but not mu-opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. Eur J Pharmacol. 1995, Jun 12;279(2-3):165-169.

[48] Lilleso J, Hammer NA, Pedersen JL, Kehlet H. Effect of peripheral morphine in a human model of acute inflammatory pain. Br J Anaesth. 2000, Aug;85(2):228-232.

[49] Shinohara A, Andoh T, Saiki I, Kuraishi Y. Analgesic effects of systemic fentanyl on cancer pain are mediated by not only central but also peripheral opioid receptors in mice. Eur J Pharmacol. 2018, Aug 15;833:275-282.

[50] Breivik H, Cherny N, Collett B, de Conno F, Filbet M, Foubert AJ, Cohen R, Dow L. Cancer-related pain: a pan-European survey of prevalence, treatment, and patient attitudes. Ann Oncol. 2009, Aug;20(8):1420-1433.

[51] Lipkowski AW, Konecka AM, Sroczynska I, Przewlocki R, Stala L, Tam SW. Bivalent opioid peptide analogues with reduced distances between pharmacophores. Life Sci. 1987, Jun 8;40(23):2283-2288.

[52] Kosson D, Klinowiecka A, Kosson P, Bonney I, Carr DB, Mayzner-Zawadzka E, Lipkowski AW. Intrathecal antinociceptive interaction between the NMDA antagonist ketamine and the opioids, morphine and biphalin. Eur J Pain. 2008, Jul;12(5):611-616.

[53] Lipkowski AW, Konecka AM, Sroczynska I. Double-enkephalins--synthesis, activity on guinea-pig ileum, and analgesic effect. Peptides. 1982, Jul-Aug;3(4):697-700.

[54] Yamazaki M, Suzuki T, Narita M, Lipkowski AW. The opioid peptide analogue biphalin induces less physical dependence than morphine. Life Sci. 2001, Jul 20;69(9):1023-1028.

[55] Silbert BS, Lipkowski AW, Cepeda MS, Szyfelbein SK, Osgood PF, Carr DB. Analgesic activity of a novel bivalent opioid peptide compared to morphine via different routes of administration. Agents Actions. 1991, Jul;33(3-4):382-387.

[56] Abbruscato TJ, Williams SA, Misicka A, Lipkowski AW, Hruby VJ, Davis TP. Blood-to-central nervous system entry and stability of biphalin, a unique double-enkephalin analog, and its halogenated derivatives. J Pharmacol Exp Ther. 1996, Mar;276(3):1049-1057.

[57] Tokuyama S, Inoue M, Fuchigami T, Ueda H. Lack of tolerance in peripheral opioid analgesia in mice. Life Sci. 1998;62(17-18):1677-1681.

[58] Ueda H, Inoue M. Peripheral morphine analgesia resistant to tolerance in chronic morphine-treated mice. Neurosci Lett. 1999, May 7;266(2):105-108.

[59] Zhu C, Tang J, Ding T, Chen L, Wang W, Mei XP, He XT, Zhang LD, Dong YL, Luo ZJ. Neuron-restrictive silencer factor-mediated downregulation of mu-opioid receptor contributes to the reduced morphine analgesia in bone cancer pain. Pain. 2017, May;158(5):879-890.

[60] Gach K, Piestrzeniewicz M, Fichna J, Stefanska B, Szemraj J, Janecka A. Opioid-induced regulation of mu-opioid receptor gene expression in the MCF-7 breast cancer cell line. Biochem Cell Biol. 2008, Jun;86(3):217-226.

[61] Viet CT, Dang D, Aouizerat BE, Miaskowski C, Ye Y, Viet DT, Ono K, Schmidt BL. OPRM1 Methylation Contributes to Opioid Tolerance in Cancer Patients. J Pain. 2017, Sep;18(9):1046-1059.

[62] Seal KH, Shi Y, Cohen G, Cohen BE, Maguen S, Krebs EE, Neylan TC. Association of mental health disorders with prescription opioids and high-risk opioid use in US veterans of Iraq and Afghanistan. JAMA. 2012, Mar 7;307(9):940-947.

[63] Zacny JP. review of the effects of opioids on psychomotor and cognitive functioning in humans. Experimental and Clinical Psychopharmacology. 1995;3: 432– 466.

[64] Meares S, Shores EA, Batchelor J, Baguley IJ, Chapman J, Gurka J, Marosszeky JE. The relationship of psychological and cognitive factors and opioids in the development of the postconcussion syndrome in general trauma patients with mild traumatic brain injury. J Int Neuropsychol Soc. 2006, Nov;12(6):792-801.

[65] Hayes RL, Galinat BJ, Kulkarne P, Becker DP. Effects of naloxone on systemic and cerebral responses to experimental concussive brain injury in cats. J Neurosurg. 1983, May;58(5):720-728.

[66] Vink R, Portoghese PS, Faden AI. kappa-Opioid antagonist improves cellular bioenergetics and recovery after traumatic brain injury. Am J Physiol. 1991, Dec;261(6 Pt 2):R1527-1532.

[67] Zohar O, Getslev V, Miller AL, Schreiber S, Pick CG. Morphine protects for head trauma induced cognitive deficits in mice. Neurosci Lett. 2006, Feb 20;394(3):239-242.

[68] Zhang J, Haddad GG, Xia Y. delta-, but not mu- and kappa-, opioid receptor activation protects neocortical neurons from glutamate-induced excitotoxic injury. Brain Res. 2000, Dec 8;885(2):143-153.

[69] Liska MG, Crowley MG, Tuazon JP, Borlongan CV. Neuroprotective and neuroregenerative potential of pharmacologically-induced hypothermia with D-alanine D-leucine enkephalin in brain injury. Neural Regen Res. 2018, Dec;13(12):2029-2037.

[70] Slaninova J, Appleyard SM, Misicka A, Lipkowski AW, Knapp RJ, Weber SJ, Davis TP, Yamamura HI, Hruby VJ. [125I-Tyr1]biphalin binding to opioid receptors of rat brain and NG108-15 cell membranes. Life Sci. 1998;62(14):PL199-204.

[71] Zohar O, Schreiber S, Getslev V, Schwartz JP, Mullins PG, Pick CG. Closed-head minimal traumatic brain injury produces long-term cognitive deficits in mice. Neuroscience. 2003;118(4):949-955.

[72] Dorsett CR, McGuire JL, DePasquale EA, Gardner AE, Floyd CL, McCullumsmith RE. Glutamate Neurotransmission in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. J Neurotrauma. 2017, Jan 15;34(2):263-272.

[73] Giza CC, Hovda DA. The new neurometabolic cascade of concussion. Neurosurgery. 2014, Oct;75 Suppl 4:S24-33.

[74] Chao D, Bazzy-Asaad A, Balboni G, Xia Y. delta-, but not mu-, opioid receptor stabilizes K(+) homeostasis by reducing Ca(2+) influx in the cortex during acute hypoxia. J Cell Physiol. 2007, Jul;212(1):60-67.

[75] Chao D, Donnelly DF, Feng Y, Bazzy-Asaad A, Xia Y. Cortical delta-opioid receptors potentiate K+ homeostasis during anoxia and oxygen-glucose deprivation. J Cereb Blood Flow Metab. 2007, Feb;27(2):356-368.

[76] Fujikawa DG. The role of excitotoxic programmed necrosis in acute brain injury. Comput Struct Biotechnol J. 2015;13:212-221.

[77] Lepage C, Yuan T, Leon S, Marshall S, Labelle P, Ferland M. Systematic review of depression in mild traumatic brain injury: study protocol. Syst Rev. 2016, Feb 6;5:23.

[78] Johnson SW, North RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. J Neurosci. 1992, Feb;12(2):483-488.

[79] Zhang H, Torregrossa MM, Jutkiewicz EM, Shi YG, Rice KC, Woods JH, Watson SJ, Ko MC. Endogenous opioids upregulate brain-derived neurotrophic factor mRNA through delta- and micro-opioid receptors independent of antidepressant-like effects. Eur J Neurosci. 2006, Feb;23(4):984-994.

[80] Rickli A, Liakoni E, Hoener MC, Liechti ME. Opioid-induced inhibition of the human 5-HT and noradrenaline transporters in vitro: link to clinical reports of serotonin syndrome. Br J Pharmacol. 2018, Feb;175(3):532-543.

[81] Ventura R, Alcaro A, Puglisi-Allegra S. Prefrontal cortical norepinephrine release is critical for morphine-induced reward, reinstatement and dopamine release in the nucleus accumbens. Cereb Cortex. 2005, Dec;15(12):1877-1886.

[82] Heinzmann JM, Kloiber S, Ebling-Mattos G, Bielohuby M, Schmidt MV, Palme R, Holsboer F, Uhr M, Ising M, Touma C. Mice selected for extremes in stress reactivity reveal key endophenotypes of major depression: a translational approach. Psychoneuroendocrinology. 2014, Nov;49:229-243.

[83] Kennedy SE, Koeppe RA, Young EA, Zubieta JK. Dysregulation of endogenous opioid emotion regulation circuitry in major depression in women. Arch Gen Psychiatry. 2006, Nov;63(11):1199-1208.

[84] Pecina M, Bohnert, A.S., Sikora, M., Avery, E.T., Langenecker, S.A., Mickey, B.J., Zubieta, J.K. Association Between Placebo-Activated Neural Systems and Antidepressant Responses: Neurochemistry of Placebo Effects in Major Depression. JAMA Psychiatry. 2015;72(11):1087-1094.

[85] Kroslak T, Laforge KS, Gianotti RJ, Ho A, Nielsen DA, Kreek MJ. The single nucleotide polymorphism A118G alters functional properties of the human mu opioid receptor. J Neurochem. 2007, Oct;103(1):77-87.

[86] Pecina M, Love T, Stohler CS, Goldman D, Zubieta JK. Effects of the Mu opioid receptor polymorphism (OPRM1 A118G) on pain regulation, placebo effects and associated personality trait measures. Neuropsychopharmacology. 2015, Mar;40(4):957-965.

[87] Panocka I, Sadowski B. Correlation between magnitude and opioid mediation of stress-induced analgesia: individual differences and the effect of selective breeding. Acta neurobiologiae experimentalis. 1990;50(6):535-538.

[88] Panocka I, Marek P, Sadowski B. Differentiation of neurochemical basis of stress-induced analgesia in mice by selective breeding. Brain Res. 1986, Nov 5;397(1):156-160.

[89] Lutfy K, Sadowski B, Kwon IS, Weber E. Morphine analgesia and tolerance in mice selectively bred for divergent swim stress-induced analgesia. Eur J Pharmacol. 1994, Nov 24;265(3):171-174.

[90] Sacharczuk M, Juszczak G, Swiergiel AH, Jaszczak K, Lipkowski AW, Sadowski B. Alcohol reverses depressive and pronociceptive effects of chronic stress in mice with enhanced activity of the opioid system. Acta neurobiologiae experimentalis. 2009;69(4):459-468.

[91] Ragan AR, Lesniak A, Bochynska-Czyz M, Kosson A, Szymanska H, Pysniak K, Gajewska M, Lipkowski AW, Sacharczuk M. Chronic mild stress facilitates melanoma tumor growth in mouse lines selected for high and low stress-induced analgesia. Stress. 2013, Sep;16(5):571-580.

[92] Slavich GM, Tartter MA, Brennan PA, Hammen C. Endogenous opioid system influences depressive reactions to socially painful targeted rejection life events. Psychoneuroendocrinology. 2014, Nov;49:141-149.

[93] Hsu DT, Sanford BJ, Meyers KK, Love TM, Hazlett KE, Walker SJ, Mickey BJ, Koeppe RA, Langenecker SA, Zubieta JK. It still hurts: altered endogenous opioid activity in the brain during social rejection and acceptance in major depressive disorder. Mol Psychiatry. 2015, Feb;20(2):193-200.

[94] Grant B, Harford, TC. Co morbidity between DSM-IV alcohol use disorders and major depression. Drug and Alcohol Dependence. 1995;39(3):197–206.

[95] Sacharczuk M, Juszczak G, Sliwa AT, Tymosiak-Zielinska A, Lisowski P, Jaszczak K, Pluta R, Lipkowski A, Sadowski B, Swiergiel AH. Differences in ethanol drinking between mice selected for high and low swim stress-induced analgesia. Alcohol. 2008, Sep;42(6):487-492.

[96] Valentino RJ, Van Bockstaele E. Endogenous opioids: opposing stress with a cost. F1000Prime Rep. 2015;7:58.

[97] Mitchell JM, O'Neil JP, Janabi M, Marks SM, Jagust WJ, Fields HL. Alcohol consumption induces endogenous opioid release in the human orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. Sci Transl Med. 2012, Jan 11;4(116):116ra116.

[98] Poznanski P, Lesniak A, Korostynski M, Szklarczyk K, Lazarczyk M, Religa P, Bujalska-Zadrozny M, Sadowski B, Sacharczuk M. Delta-opioid receptor antagonism leads to excessive ethanol consumption in mice with enhanced activity of the endogenous opioid system. Neuropharmacology. 2017, May 15;118:90-101.

[99] Poznanski P, Lesniak A, Korostynski M, Sacharczuk M. Ethanol consumption following mild traumatic brain injury is related to blood-brain barrier permeability. Addict Biol. 2018, Oct 18.

[100] Sacharczuk M, Lesniak A, Korostynski M, Przewlocki R, Lipkowski A, Jaszczak K, Sadowski B. A polymorphism in exon 2 of the delta-opioid receptor affects nociception in response to specific agonists and antagonists in mice selectively bred for high and low analgesia. Pain. 2010, Jun;149(3):506-513.

[101] Roberts AJ, Gold LH, Polis I, McDonald JS, Filliol D, Kieffer BL, Koob GF. Increased ethanol self-administration in delta-opioid receptor knockout mice. Alcohol Clin Exp Res. 2001, Sep;25(9):1249-1256.

[102] Hauser SR, Getachew B, Taylor RE, Tizabi Y. Alcohol induced depressive-like behavior is associated with a reduction in hippocampal BDNF. Pharmacol Biochem Behav. 2011, Dec;100(2):253-258.

[103] Ab Aziz CB, Ahmad AH. The role of the thalamus in modulating pain. Malays J Med Sci. 2006, Jul;13(2):11-18.

[104] Wilson HD, Uhelski ML, Fuchs PN. Examining the role of the medial thalamus in modulating the affective dimension of pain. Brain Res. 2008, Sep 10;1229:90-99.

[105] Ko MC, Lee H, Harrison C, Clark MJ, Song HF, Naughton NN, Woods JH, Traynor JR. Studies of micro-, kappa-, and delta-opioid receptor density and G protein activation in the cortex and thalamus of monkeys. J Pharmacol Exp Ther. 2003, Jul;306(1):179-186.

[106] Dafny N, Dong WQ, Prieto-Gomez C, Reyes-Vazquez C, Stanford J, Qiao JT. Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. Neuroscience. 1996, Jan;70(2):449-460.

[107] Heinricher MM, Morgan MM, Tortorici V, Fields HL. Disinhibition of off-cells and antinociception produced by an opioid action within the rostral ventromedial medulla. Neuroscience. 1994, Nov;63(1):279-288.

[108] Taylor JJ, Borckardt JJ, George MS. Endogenous opioids mediate left dorsolateral prefrontal cortex rTMS-induced analgesia. Pain. 2012, Jun;153(6):1219-1225.

[109] Wilson MA, Junor L. The role of amygdalar mu-opioid receptors in anxiety-related responses in two rat models. Neuropsychopharmacology. 2008, Nov;33(12):2957-2968.

[110] May MB, Glode AE. Dronabinol for chemotherapy-induced nausea and vomiting unresponsive to antiemetics. Cancer Manag Res. 2016;8:49-55.

[111] Russo M, Naro A, Leo A, Sessa E, D'Aleo G, Bramanti P, Calabro RS. Evaluating Sativex(R) in Neuropathic Pain Management: A Clinical and Neurophysiological Assessment in Multiple Sclerosis. Pain Med. 2016, Jun;17(6):1145-1154.

[112] Hausman-Kedem M, Menascu S, Kramer U. Efficacy of CBD-enriched medical cannabis for treatment of refractory epilepsy in children and adolescents - An observational, longitudinal study. Brain Dev. 2018, Aug;40(7):544-551.

[113] Sacharczuk M, Ragan AR, Szymanska H, Lesniak A, Sadowski B, Lipkowski AW. Distinct susceptibility to inoculated melanoma and sensitivity to cancer pain in mouse lines with high and low sensitivity to stress. Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer. 2012;31(2):167-177.

[114] Blaszczyk JW, Lapo IB, Werka T, Sadowski B. Differential startle magnitude in mice selected for high and low swim analgesia is not related to difference in nociception. Acta neurobiologiae experimentalis. 2010;70(4):398-405.

[115] Mogil JS, Sternberg WF, Balian H, Liebeskind JC, Sadowski B. Opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia: a parametric analysis in mice. Physiol Behav. 1996, Jan;59(1):123-132.

Anna Leśniak