

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej



Bartłomiej Szulczyk

Modulacja kanałów jonowych i potencjału błonowego przez receptory dopaminergiczne i adrenergiczne w neuronach piramidowych kory przedczołowej.

**Autoreferat
(załącznik nr 2)**

Warszawa 2016

1 Imię i nazwisko : Bartłomiej Szulczyk

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

2002 dyplom lekarza medycyny - I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

2006 stopień doktora nauk medycznych - I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Tytuł rozprawy doktorskiej :

„Zmiany plastyczne prądów Na^+ i K^+ w neuronach współczulnych gruczołowych po ich odnerwieniu” - obrona z wyróżnieniem, promotor: prof. Hubert Kwieciński

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

2003-2006 studia doktoranckie w Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

2007-2012 adiunkt w Zakładzie Fizjologii Człowieka (obecnie Zakład Fizjologii i Patofizjologii Człowieka), Warszawski Uniwersytet Medyczny

2012-2016 adiunkt w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej

4 Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a tytuł osiągnięcia naukowego/~~artystycznego~~,

Tytuł osiągnięcia : Modulacja kanałów jonowych i potencjału błonowego przez receptory dopaminergiczne i adrenergiczne w neuronach piramidowych kory przedczołowej.

Podstawą osiągnięcia jest cykl 4 publikacji w czasopismach o międzynarodowym zasięgu o zsumowanym współczynniku IF = 9,3

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),

1. Witkowski G, Szulczyk B, Rola R, Szulczyk P. (2008) D(1) dopaminergic control of G protein-dependent inward rectifier K(+) (GIRK)-like channel current in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. Neuroscience, 155, 53-63.

Razem z innymi autorami badałem wpływ agonisty receptora D1 na kanały jonowe K⁺ typu GIRK w neuronach piramidowych kory przedczołowej. Sam wykonałem rejestracje dotyczące wpływu inhibitorów kanałów typu GIRK na potencjał błonowy w skrawkach kory przedczołowej oraz zbadałem wpływ substancji biologicznie czynnych na ten potencjał. Swój udział w pracy szacuję na 60%.

IF=3,5 punkty MNiSW=27

2. Szulczyk B, Książek A, Ładno W, Szulczyk P. (2012) Effect of dopamine receptor stimulation on voltage-dependent fast-inactivating Na⁺ currents in medial prefrontal cortex (mPFC) pyramidal neurons in adult rats. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 72, 1-14.

Rozwinałem w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii WUM metodę rejestracji prądów sodowych w konfiguracji makrołatek i potencjałów błonowych w konfiguracji gramicydynowej w skrawkach kory mózgowej. Przeprowadziłem wszystkie rejestracje przy pomocy powyższych metod w celu przebadania wpływu agonisty receptora D1 na prądy sodowe. Swój udział w przygotowaniu koncepcji pracy, wykonaniu i analizie doświadczeń oraz przygotowaniu publikacji do druku oceniam na 85%.

IF=2,0 punkty MNiSW=15

3. Szulczyk B. (2015) β-adrenergic receptor agonist increases voltage-gated Na⁺ currents in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. Neuroscience Letters, 59, 87-93.

Praca została wykonana w całości przeze mnie (udział 100 %). Jestem autorem koncepcji publikacji, sam wykonałem wszystkie eksperymenty, sam napisałem i opublikowałem manuskrypt.

IF=2,0 punkty MNiSW=20

4. Szulczyk B. (2016) Somatic and dendritic perforated-patch recordings reveal β -adrenergic receptor-induced depolarization in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *Acta Neurobiologie Experimentalis*, 76, 158-164.

Mój udział wynosi 100 %. Jestem autorem koncepcji publikacji, sam wykonałem wszystkie eksperymenty, sam napisałem i opublikowałem manuskrypt.

IF=1,7 punkty MNiSW=15

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

Wstęp

W neuronach korowych występują tzw. przedłużone depolaryzacje błony komórkowej (z ang. prolonged depolarization lub up-states lub self-maintained depolarizations). Przedłużone depolaryzacje są to odchylenia potencjału błonowego spoczynkowego w kierunku potencjałów mniej ujemnych i trwające zwykle od kilku do kilkudziesięciu sekund. Przedłużone depolaryzacje mogą mieć tak dużą amplitudę, że aktywują potencjałozależne kanały jonowe głównie Na^+ co powoduje powstanie na szczycie depolaryzacji serii potencjałów czynnościowych.

Przedłużone depolaryzacje występują, między innymi, w neuronach korowych w czasie snu NREM i w czasie znieczulenia ogólnoustrojowego (Beltramo i wsp. 2013; Crunelli i Hughes, 2010), w korze czuciowej (Petersen i wsp. 2003) oraz w neuronach piramidowych kory przedczołowej (Goldman-Rakic, 1995; Durstewitz i wsp. 2000).

Szczególne znaczenie przypisuje się przedłużonym depolaryzacjiom występującym w neuronach piramidowych kory przedczołowej. Uważa się, że depolaryzacje te są funkcjonalnym odzwierciedleniem pamięci operacyjnej (Goldman Rakic 1995, Durstewitz i wsp. 2000). Pamięć operacyjna polega na krótkotrwałym przechowywaniu informacji i wykorzystaniu ich w celu wykonywania bieżących czynności (Durstewitz i wsp. 2000). Pamięć operacyjna jest niezbędna do realizacji funkcji poznawczych takich jak np.: planowanie, podejmowanie decyzji, rozumienie i rozumowanie (Plakke i wsp. 2015). W związku z tym dysfunkcja pamięci operacyjnej może prowadzić do zaburzeń funkcji poznawczych (Trivedi 2006), co jest cechą wielu chorób neuropsychiatrycznych (Hains i Arnsten 2008). Zaburzenie pamięci operacyjnej występuje w schizofrenii, otępieniu starczym, zespole nadaktywności psychoruchowej, zaburzeniach nastroju, zaburzeniach lękowych - rozpowszechnionych i kosztownych w leczeniu patologii (Hains i Arnsten 2008, Trivedi 2006). W związku z tym badania nad mechanizmem powstawania przedłużonych depolaryzacji w neuronach piramidowych są intensywnie prowadzone ze względów poznawczych i praktycznych.

Zakłada się, że przedłużone depolaryzacje w neuronach piramidowych kory przedczołowej zależą od:

- a. właściwości struktur komórkowych głównie kanałów jonowych neuronu (Tseng i O'Donnell 2005), i/lub
- b. kontroli neuronów piramidowych kory przedczołowej przez neuroprzekazniki (Tseng i O'Donnell 2005).

Istotną rolę w regulacji funkcji neuronów kory przedczołowej odgrywają dwa neuroprzekazniki: noradrenalina i dopamina. Neurony, których zakończenia aksonalne wydzielają w korze przedczołowej noradrenalinę i dopaminę posiadają swoje ciała komórkowe odpowiednio w jądrze miejsca sinawego i w obszarze brzusznej nakrywki pnia mózgu (Hains i Arnsten 2008; Tseng i wsp. 2006). Noradrenalina i dopamina wpływają na funkcjonowanie neuronów poprzez działanie na receptory metabotropowe noradrenergiczne i dopaminergiczne. Wymienione receptory kontrolują funkcje efektorów komórkowych błonowych, cytoplazmatycznych lub jądrowych za pośrednictwem białek G i wtórnych przekazników cytoplazmatycznych (Maurice i wsp. 2001).

Stwierdzono, że zbyt wysoki poziom dopaminy i noradrenaliny w korze przedczołowej występujący w sytuacjach stresowych i w zespole stresu pourazowego może upośledzać funkcjonowanie pamięci operacyjnej (Hains i Arnsten 2008). Również zbyt niski poziom katecholamin w korze przedczołowej występujący w schizofrenii może powodować zaburzenia pamięci operacyjnej (Arnsten 2011). W związku z tym poziom uwalnianej dopaminy i noradrenaliny musi być optymalny w celu zapewnienia prawidłowego funkcjonowania kory przedczołowej (Hains i Arnsten 2008).

Substancje farmakologiczne wiążące się z receptorami dopaminergicznymi i adrenergicznymi w korze przedczołowej mogą poprawiać jej funkcje poznawcze. Wykazano na przykład, że agoniści receptora dopaminergicznego typu D1 poprawiają pamięć operacyjną w zwierzęcych modelach schizofrenii (Roberts i wsp. 2010). Wykazano również, że selektywny antagonist receptoru adrenergicznego typu β_1 bataxolol podawany do kory przedczołowej powoduje poprawę pamięci operacyjnej u osobników zdrowych (Ramos i wsp. 2005).

W związku z powyższym istotne jest poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę aktywności neuronów piramidowych przez noradrenalinę i dopaminę. Być może modyfikowanie funkcji układów przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego lub efektorów komórkowych, które są kontrolowane przez receptory dopaminergiczne i noradrenergiczne, będzie miało lepsze efekty terapeutyczne niż działanie na receptor metabotropowy.

Skrócone omówienie osiągnięcia

W publikacjach swojego cyklu habilitacyjnego postanowiłem przebadać wpływ pobudzenia receptorów dopaminergicznych i β -adrenergicznych na potencjał błonowy i kanały jonowe neuronów piramidowych kory przedczołowej w warunkach w których środowisko wewnątrzkomórkowe zostało nienaruszone. Gwarantowało to obecność struktur i związków wewnątrzkomórkowych, które pośredniczą w przekazywaniu informacji od receptorów błonowych do efektorów komórkowych.

Moim osiągnięciem metodycznym było zastosowanie i rozwinięcie w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii WUM różnych technik rejestracji prądów i potencjałów ze skrawków kory mózgowej. Metody te zastosowałem w swoich publikacjach, które należą do cyklu

habilitacyjnego jak również w innych publikacjach i doniesieniach zjazdowych, które ukazały się po obronie pracy doktorskiej.

Publikacja nr 1 cyklu wykazuje, że pobudzenie receptora dopaminergicznego powoduje depolaryzację potencjału błonowego w mechanizmie blokowania kanałów jonowych K^+ typu GIRK w neuronach piramidowych kory przedczołowej. Publikacja nr 2 wykazuje, że pobudzenie receptora dopaminergicznego obniża próg pobudzenia potencjałozależnych prądów jonowych Na^+ w neuronach piramidowych kory przedczołowej. W publikacji nr 3 wykazano, że pobudzenie receptora β -adrenergicznego również obniża próg pobudzenia prądów jonowych Na^+ w neuronach piramidowych kory przedczołowej. W publikacji nr 4 natomiast wykazano, że aktywacja receptora β -adrenergicznego powoduje depolaryzację potencjału błonowego w ciele komórkowym i w dendrycie apikalnym neuronów piramidowych kory przedczołowej.

Cykl moich publikacji wykazuje, że aktywacja receptorów adrenergicznych lub dopaminergicznych prowadzi do depolaryzacji błony komórkowej i obniżenia progu pobudzenia potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ w neuronach piramidowych kory przedczołowej. Te dwa czynniki sprzyjają powstawaniu przedłużonych aktywności neuronów piramidowych kory przedczołowej.

Publikacja nr 1 cyklu habilitacyjnego

Witkowski G, **Szulczyk B**, Rola R, Szulczyk P. (2008) D(1) dopaminergic control of G protein-dependent inward rectifier $K(+)$ (GIRK)-like channel current in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 155, 53-63.

Liczni autorzy wykazali, że receptory metabotropowe dopaminergiczne mają wpływ na działanie pamięci operacyjnej oraz biorą udział w mechanizmie powstawania przedłużonych depolaryzacji w neuronach piramidowych kory przedczołowej (np.: Goldman Rakic 1995; Tseng i O'Donnell 2005). Celem przedstawionej publikacji było zbadanie w jakim mechanizmie receptory dopaminergiczne regulują potencjał błonowy w neuronach piramidowych kory przedczołowej szczurów młodych a w szczególności jaki system

przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego oraz jaki efektor są odpowiedzialne za zależną od dopaminy zmianę potencjału błonowego.

Potencjalnym efektem kontrolowanym przez receptory dopaminergiczne są kanały jonowe typu GIRK (G protein-dependent inward rectifier K^+ channels). Kanały te są konstytutywnie aktywne i selektywnie przewodne dla jonów K^+ . W związku z tym zmniejszenie prawdopodobieństwa ich otwarć wywołuje depolaryzację błony komórkowej.

W celu uniknięcia wypłukiwania wtórnych przekaźników cytoplazmatycznych pojedyncze kanały jonowe rejestrowano metodą łątkową z rozproszonych neuronów piramidowych kory przedczołowej. Ponadto rejestracje wykonywano w płynie zewnątrzkomórkowym zawierającym wysokie stężenie jonów K^+ . Zapewniło to ustabilizowanie potencjału błonowego neuronu na poziomie około 0 mV. Dzięki temu potencjał błonowy badanych neuronów był ściśle kontrolowany.

Rejestrowane kanały jonowe w błonie komórkowej neuronów piramidowych posiadały następujące właściwości: przy potencjale błonowym -75 mV prawdopodobieństwo ich otwarć (NPo) wynosiło $2.5 \pm 0.3 \times 10^{-3}$; średni czas otwarć 0.53 ± 0.05 ms i przewodność 29.9 ± 1.6 pS. Prąd jonowy tego kanału miał charakter dokońrkowy prostowniczy. Kanał ten był blokowany przez tertiapinę i aktywowany przez baklofen. Wymienione właściwości wskazywały, że był to kanał jonowy K^+ typu GIRK.

Prawdopodobieństwo otwarć tego kanału odwracalnie zmniejszało się po podaniu selektywnych agonistów receptora dopaminergicznego typu D1 (SKF 38393 i SKF 81297). Hamowanie aktywności kanałów typu GIRK było znoszone po podaniu inhibitorów kinazy białkowej typu C (chelerytryny i kalfostyny). Wynik ten wskazuje, że kanały jonowe typu GIRK są hamowane w czasie aktywacji receptorów dopaminergicznych typu D1 oraz że w przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego pośredniczy kinaza białkowa typu C.

Kolejne rejestracje prowadzono w skrawkach kory przedczołowej szczurów młodych.

Wykazano, że antagonistą kanałów typu GIRK SCH 23390, będący również blokerem receptora dopaminergicznego D1, wywołuje depolaryzację potencjału błonowego. Ponadto udowodniono, że inhibitor kanałów typu GIRK ifenprodil także, w sposób odwracalny, depolaryzuje potencjał błonowy badanych neuronów.

Następnie wykazano, że pobudzenie receptorów typu D1 wywołuje odwracalną depolaryzację potencjału błonowego na drodze hamowania kanałów jonowych typu GIRK. Stwierdzono

również, że podanie zewnątrzkomórkowe jonów Ba^{++} , które są inhibitorami kanałów jonowych typu GIRK, wywołuje depolaryzację błony komórkowej. Po zablokowaniu kanałów jonowych typu GIRK przez jony Ba^{++} depolaryzacja zależna od pobudzenia receptora dopaminergicznego typu D1 była znoszona.

Podsumowując, wyniki tej pracy wskazują, że aktywacja receptorów dopaminergicznych typu D1 wywołuje depolaryzację, która zależy od zmniejszenia prawdopodobieństwa otwarcia kanałów jonowych typu GIRK. System przekazywania sygnału zależał od aktywacji kinazy białkowej typu C.

Depolaryzacja błony komórkowej zależna od aktywacji receptorów dopaminergicznych typu D1 może ułatwiać powstawanie przedłużonych aktywności neuronów piramidowych kory przedczołowej.

Publikacja nr 2 cyklu habilitacyjnego

Szulczyk B, Książek A, Ładno W, Szulczyk P. (2012) Effect of dopamine receptor stimulation on voltage-dependent fast-inactivating Na^+ currents in medial prefrontal cortex (mPFC) pyramidal neurons in adult rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 72, 1-14.

Jak wspomniano powyżej przedłużone depolaryzacje w neuronach piramidowych kory przedczołowej mogą odgrywać istotną rolę w działaniu pamięci operacyjnej. Na szczycie przedłużonych depolaryzacji występują często serie potencjałów czynnościowych o ile przedłużone depolaryzacje przekroczą wartość progową dla potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ .

Celem publikacji było zbadanie wpływu pobudzenia receptorów dopaminergicznych na właściwości potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ w neuronach piramidowych szczurów dorosłych zlokalizowanych w skrawkach w warstwie V kory przedczołowej.

Również celem pracy było zbadanie mechanizmu przekazywania sygnału od receptora dopaminergicznego do badanych potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ .

Metodyka

W celu wykonania badań opisanych w publikacjach cyklu habilitacyjnego rozwinąłem w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii WUM metodę rejestracji prądów Na^+ w konfiguracji makrołatek (cell-attached) oraz metodę rejestracji potencjału błonowego w konfiguracji perforowanych łątek. Potencjałozależne prądy jonowe Na^+ i potencjały błonowe rejestrowałem w neuronach zlokalizowanych w skrawkach kory przedczołowej szczurów. Neurony w skrawkach znajdują się w środowisku zbliżonym do fizjologicznego.

Przygotowałem procedurę pozyskiwania skrawków z kory mózgowej szczurów dorosłych (publikacja nr 2), która jest odmienna od procedury przygotowania skrawków z kory mózgowej szczurów młodych (publikacja nr 1, 3 i 4). Przygotowałem również procedurę identyfikacji neuronów oraz tworzenia złącza gigaomowego między czubkiem pipety a błoną neuronu zlokalizowanego w skrawku kory przedczołowej.

Receptor typu D1 jest receptorem metabotropowym sprzężonym z białkiem G, który reguluje funkcje komórki za pośrednictwem wtórnych przekaźników cytoplazmatycznych (Maurice i wsp. 2001). Rozwinięta przeze mnie metoda umożliwia rejestrację potencjałozależnych prądów jonowych Na^+ z neuronów zlokalizowanych w skrawkach w konfiguracji makrołatek (bez przebijania błony komórkowej). Prądy jonowe Na^+ rejestrowano z łątki znajdującej się pod pipetą. Rejestracje te są trudne technicznie i wymagają wyeliminowania tak zwanego artefaktu bodźca, który jest rejestrowany razem z prądami jonowymi Na^+ . W celu wyeliminowania artefaktu związanego z bodźcem elektrycznym (który powstawał w chwili skokowej depolaryzacji błony komórkowej) rejestrowałem prądy jonowe Na^+ razem z artefaktem, a następnie rejestrowałem sam artefakt po inaktywowaniu prądów jonowych Na^+ . Po odjęciu powyższych rejestracji uzyskiwałem wyizolowany, potencjałozależny prąd jonowy Na^+ .

Ponieważ w błonie pod pipetą znajdowała się niewielka liczba potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ amplituda rejestrowanych prądów sodowych była bardzo mała (rzędu 20-30 pA). W celu uzyskania satysfakcjonujących rejestracji prądów jonowych kanałowych redukowałem szumy rejestracji przez pokrycie pipet elastomerem (Sylgard) oraz utrzymywanie

niskiego poziomu płynu w komorze rejestracyjnej. Ponadto, w celu zwiększenia amplitudy rejestrowanych prądów jonowych w stosunku do szumów stosowałem wielokrotne uśrednianie rejestrowanego sygnału.

Po zakończonej rejestracji prądów sodowych przebijałem błonę pod pipetą przy pomocy podciśnienia w celu zmierzenia potencjału błonowego neuronu.

W celu wykonania badań opisanych w publikacji nr 2 opracowałem procedurę rejestracji potencjału błonowego metodą perforowanych łątek w neuronach piramidowych zlokalizowanych w skrawkach u szczurów dorosłych. W tym celu do płynu wewnątrz pipety rejestracyjnej, oprócz innych związków, dodawałem antybiotyk polipeptydowy gramicydynę. Po wytworzeniu złącza wysokooporowego między czubkiem pipety a błoną neuronu gramicydyna tworzyła w błonie łątki kanały przewodne dla kationów jednowartościowych. Otrzymywałem w ten sposób dostęp elektryczny do neuronu co umożliwiało rejestrację potencjałów błonowych. Zastosowanie tej metody gwarantowało utrzymanie stałości środowiska wewnątrzkomórkowego i tym samym zachowanie wtórnych przekazników wewnątrzkomórkowych.

Wyniki otrzymane w publikacji nr 2 cyklu habilitacyjnego

Badane neurony piramidowe zlokalizowane były w skrawkach kory przedczołowej szczurów dorosłych. Wykazano, że podanie agonisty receptora dopaminergicznego typu D1 nie wpływa na maksymalną amplitudę potencjałozależnych prądów jonowych Na^+ , ale powoduje obniżenie ich progu pobudzenia (przesunięcie krzywej aktywacji w kierunku hiperpolaryzacji).

Następnie zbadano mechanizm przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego od receptora D1 do potencjałzależnego kanału jonowego Na^+ . Wykazano, że podanie zewnątrzkomórkowe rozpuszczalnego w lipidach analogu cAMP wywiera taki sam wpływ na potencjałozależne prądy jonowe Na^+ jak aktywacja receptora dopaminergicznego typu D1, to znaczy, przesuwają krzywą aktywacji tych prądów w kierunku hiperpolaryzacji (obniża ich próg pobudzenia). Podanie analogu cAMP nie miało wpływu na potencjał błonowy. Wynik ten wskazuje, że przekazywanie sygnału wewnątrzkomórkowego od receptora typu D1 do kanału jonowego Na^+ może być zależne od cAMP.

cAMP może modyfikować właściwości kanałów jonowych Na^+ bezpośrednio lub wtórnie za pośrednictwem aktywacji kinazy białkowej A, która fosforyluje kanał jonowy Na^+ i zmienia jego właściwości kinetyczne. W celu rozstrzygnięcia, która z tych możliwości jest prawdziwa badano wpływ agonisty receptora D1 na prądy jonowe Na^+ w obecności inhibitora kinazy białkowej A (H-89). Po zablokowaniu tej kinazy aktywacja receptora dopaminergicznego typu D1 nie miała wpływu na krzywa napięciowo-prądową i próg aktywacji potencjałozależnych prądów jonowych Na^+ . W związku z tym za przekazywanie sygnału od receptora dopaminergicznego typu D1 do potencjałozależnego kanału Na^+ w neuronach piramidowych kory przedczołowej odpowiada kinaza białkowa A.

Podsumowując rejestracje w konfiguracji bez przebicia błony komórkowej wykazały, że agonista receptora D1 obniża próg aktywacji kanałów jonowych Na^+ i nie zmienia ich maksymalnej amplitudy. Wynik ten był zasadniczo odmienny od dotychczasowych założeń. Dotychczas wskazywano, że amplituda potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ w neuronach piramidowych kory przedczołowej i hipokampa zmniejsza się, a próg ich aktywacji nie ulega zmianie w czasie aktywacji receptorów dopaminergicznym typu D1 (Maurice i wsp. 2001; Cantrell i wsp. 1999).

W celu wyjaśnienia tych rozbieżności powtórzono w publikacji nr 2 badania przy zastosowaniu metody używanej przez autorów cytowanych powyżej, tzn. badano wpływ agonisty receptora dopaminergicznego typu D1 na prądy jonowe Na^+ po przebiciu błony komórkowej neuronów piramidowych (whole-cell voltage-clamp). W tej sytuacji rzeczywiście amplituda prądów jonowych Na^+ ulegała zmniejszeniu, a próg ich pobudzenia pozostawał bez zmian.

Wyniki te wskazują jednoznacznie, że wypłukanie wtórnych przekaźników cytoplazmatycznych (przy zastosowaniu metody „whole-cell voltage-clamp”) może zmieniać mechanizm kontroli kanałów jonowych przez receptory metabotropowe.

Zwiększenie efektywności prądów Na^+ w następstwie aktywacji receptorów dopaminergicznym typu D1 w neuronach piramidowych kory przedczołowej zostało potwierdzone przez inne laboratorium (Gorelova i Seamans 2015), kilka lat po ukazaniu się publikacji nr 2 cyklu. Cytowani autorzy również nie przebijali błony komórkowej w celu oceny aktywności prądów jonowych Na^+ po aktywacji receptorów dopaminergicznym.

W konfiguracji makrołatek potencjał błonowy nie jest kontrolowany. Istniała możliwość, że agonista receptora dopaminergicznego typu D1 wpływa nie tylko na kanały Na^+ ale również na potencjał błonowy badanych neuronów. Gdyby tak było wyniki dotyczące wpływu agonisty receptora D1 na prądy jonowe Na^+ byłyby trudne do interpretacji. W celu rozwiązania tego problemu zarejestrowano potencjał błonowy z zastosowaniem metody gramicydynowej. Wykazano, że agonista receptora D1 nie wpływa na potencjał błonowy badanych neuronów szczurów dorosłych. W związku z tym zmiany właściwości kinetycznych prądów jonowych Na^+ w odpowiedzi na podanie agonisty receptora D1 nie mogły być wtórne do zmian potencjału błonowego. Należy podkreślić, że badanie wpływu receptorów dopaminergicznych na potencjałozależne kanały jonowe Na^+ u szczurów dorosłych jest korzystne (jest to wygodny model), ponieważ aktywacja receptora dopaminergicznego typu D1 nie zmienia potencjału błonowego i nie wpływa wtórnie na aktywność kanałów Na^+ .

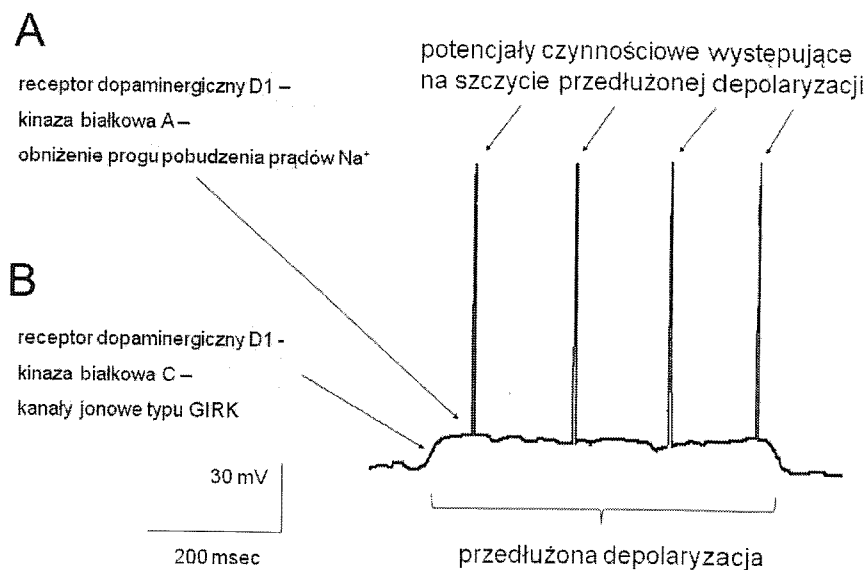
Wnioski z publikacji nr 1 i 2 cyklu

Przedłużone depolaryzacje w neuronach piramidowych kory przedczołowej prowadzą do tzw. przetrwałych aktywności czyli serii potencjałów czynnościowych na szczycie depolaryzacji.

Receptory dopaminergiczne typu D1 uczestniczą w powstawaniu przedłużonych depolaryzacji w neuronach piramidowych kory przedczołowej. W publikacji nr 1 wykazano, że aktywacja tych receptorów prowadzi do zamknięcia kanałów K^+ typu GIRK i depolaryzacji błony komórkowej. W przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego bierze udział kinaza białkowa typu C. Przedłużone depolaryzacje mogą być podprogowe dla potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ . W publikacji nr 2 wykazano, że aktywacja receptorów dopaminergicznych typu D1 prowadzi również do aktywacji kinazy białkowej A i obniżenia progu pobudzenia potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ . Obniżenie progu pobudzenia tych kanałów ułatwia powstanie serii potencjałów czynnościowych na szczycie przedłużonych depolaryzacji.

Należy podkreślić, że w powstawaniu przedłużonych depolaryzacji, oprócz receptorów dopaminergicznych typu D1, uczestniczą również inne receptory na przykład typu NMDA (Tseng i O'Donnell 2005).

Hipotezę przedstawiającą wpływ agonisty receptora dopaminergicznego na przedłużone depolaryzacje przedstawiono na poniższej rycinie nr 1.



Rycina 1. Wpływ pobudzenia receptorów dopaminergicznych D1 na potencjał błonowy i próg pobudzenia potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ w neuronach piramidowych kory przedczołowej.

A. Aktywacja receptorów D1 powoduje obniżenie progu aktywacji potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ . W przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego pośredniczy kinaza białkowa typu A. B. Aktywacja receptora typu D1 powoduje również depolaryzację błony komórkowej zależną od hamowania aktywności kanałów typu GIRK. W przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego pośredniczy kinaza białkowa typu C.

Publikacja nr 3 cyklu habilitacyjnego

Szulczyk B. (2015) β -adrenergic receptor agonist increases voltage-gated Na^+ currents in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *Neuroscience Letters*, 59, 87-93.

Celem pracy było zbadanie wpływu pobudzenia receptorów β -adrenergicznych na potencjałozależne prądy jonowe Na^+ w neuronach piramidowych kory przedczołowej oraz zbadanie jaki jest mechanizm przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego od receptora β -adrenergicznego do kanałów jonowych Na^+ u szczurów młodych.

W celu rejestracji potencjałów błonowych zastosowałem metodę perforowanych łątek (przy użyciu gramicydyny). Stwierdziłem, że agonista receptora β -adrenergicznego izoproterenol wywołuje depolaryzację neuronów piramidowych kory przedczołowej. Depolaryzacja błony komórkowej wywołana przez aktywację receptorów β -adrenergicznych może zależeć od zamknięcia konstytutywnie aktywnych kanałów jonowych K^+ np.: typu GIRK, IRK i innych kanałów K^+ tzw. przeciekowych lub zwiększenia przewodności kanałów jonowych Na^+ np.: typu HCN (I_h). Kanały typu HCN oraz część kanałów jonowych K^+ jest blokowana w obecności jonów Cs^+ w sztucznym płynie zewnątrzkomórkowym. Wykazałem, że w obecności jonów Cs^+ izoproterenol nie wywołuje depolaryzacji potencjału błonowego badanych neuronów. Dlatego wszystkie rejestracje potencjałozależnych prądów Na^+ wykonywałem w obecności jonów Cs^+ w środowisku zewnątrzkomórkowym. W tych warunkach doświadczalnych zmiana właściwości kinetycznych kanałów jonowych Na^+ przez izoproterenol wynikała z wpływu na kanał a nie ze zmian potencjału błonowego.

Wykazałem również, że wpływ aktywacji receptora β -adrenergicznego na potencjał błonowy zależy od wzrostu przewodności kanałów I_h a nie od stale otwartych kanałów jonowych K^+ ponieważ zależna od izoproterenu depolaryzacja była znoszona po podaniu selektywnego antagonisty kanałów I_h .

Prądy jonowe Na^+ wywoływałem przez prostokątne bodźce depolaryzujące błonę komórkową. Podanie agonisty receptora β -adrenergicznego izoproterenu nie wpływało na maksymalną amplitudę prądów Na^+ ale przesunęło krzywą aktywacji tych prądów w kierunku hiperpolaryzacji czyli powodowało obniżenie progu ich aktywacji.

Izoproterenol, który aktywuje zarówno receptory β_1 jak i β_2 -adrenergiczne, nie wpływał na badane prądy Na^+ w obecności nieselektywnego antagonisty receptora β -adrenergicznego propranololu. Podanie selektywnego antagonisty receptora β_1 -adrenergicznego metoprololu również znosiło wpływ izoproterenu na kanały jonowe Na^+ . Jest to dowód na to, że izoproterenol wpływa na kanały Na^+ poprzez aktywację receptora β_1 -adrenergicznego.

Następnie zbadałem jakie kinazy białkowe biorą udział w przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego od receptora β -adrenergicznego do kanału jonowego Na^+ . W obecności antagonisty kinazy białkowej A (H-89) efekt działania izoproterenu na kanały

jonowe Na^+ był częściowo zniesiony. W następnej serii eksperymentów zbadalem czy rozważany efekt izoproterenolu zależy od kinazy białkowej C. W obecności antagonisty kinazy białkowej C (chelerytryny) w sztucznym płynie zewnątrzkomórkowym efekt izoproterenolu na prądy jonowe Na^+ był również częściowo zniesiony. Po jednoczesnym zablokowaniu kinazy białkowej A i C obniżenie progu aktywacji prądów jonowych Na^+ pod wpływem działania izoproterenolu było całkowicie zniesione.

W związku z tym kinazy białkowe C i A są zaangażowane w przekazywanie sygnału od receptora β -adrenergicznego do kanału jonowego Na^+ .

Wnioski z publikacji 3

Wyniki badań przedstawionych w publikacji nr 3 wskazują, że aktywacja receptorów β -adrenergicznych w neuronach piramidowych kory przedczołowej prowadzi do depolaryzacji błony komórkowej czyli może być jednym z czynników odpowiedzialnych za powstawanie przedłużonych depolaryzacji w neuronach piramidowych kory przedczołowej.

Aktywacja receptorów β_1 prowadzi również do obniżenia progu aktywacji potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ . W przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego pośredniczyła kinaza białkowa A i C. Proces ten może ułatwiać powstawanie serii potencjałów czynnościowych występujących na szczycie przedłużonych depolaryzacji w neuronach piramidowych kory przedczołowej.

Efekt fizjologiczny i funkcjonalny pobudzenia receptorów dopaminergicznych typu D1 i noradrenergicznych typu β_1 jest podobny jednak systemy przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego odpowiedzialne za zmniejszenie progu pobudzenia kanałów jonowych Na^+ są częściowo odmienne.

Publikacja nr 4 cyklu habilitacyjnego

Szulczyk B. (2016) Somatic and dendritic perforated-patch recordings reveal β -adrenergic receptor-induced depolarization in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 76, 158-164.

Dotychczasowe badania właściwości struktur błonowych odpowiedzialnych za aktywność neuronów w przeważającej większości przypadków (publikacji) dotyczą struktur zlokalizowanych w obszarze ciała komórkowego neuronów. Badania takie mogą być obarczone błędem polegającym na tym, że struktury głównie odpowiedzialne za powstawanie potencjału błonowego, zmianę potencjału błonowego i powstawanie potencjałów czynnościowych są zlokalizowane przede wszystkim w dendrytach oraz we wzgórku aksonu a nie w obszarze ciała komórkowego. Prawdopodobnie odmienne struktury odpowiedzialne za aktywność neuronu są zlokalizowane w różnych przedziałach (compartments) neuronu: w dendrytach (i różnych częściach dendrytów), w ciele komórkowym, we wzgórku aksonu i samym aksonie (Berger i wsp. 2001; Gorelova i Seamans 2015).

Rejestracje potencjałów błonowych i kanałów jonowych dendrytów są przeprowadzane bardzo rzadko. Jest to spowodowane trudnościami metodycznymi związanymi z rejestracjami aktywności np.: kanałów jonowych w tak małych strukturach jakimi są dendryty.

Celem publikacji nr 4 cyklu było zbadanie wpływu pobudzenia receptora β -adrenergicznego na potencjał błonowy w ciele komórkowym i w dendrytach apikalnych neuronów piramidowych kory przedczołowej szczurów młodych. Celem pracy było również zbadanie mechanizmu przekazywania sygnału pomiędzy receptorem i efektem błonowym kontrolowanym przez receptory β -adrenergiczne.

Celowo wybrano układ doświadczalny dotyczący mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę potencjału błonowego przez receptory β -adrenergiczne w neuronach piramidowych kory przedczołowej, ponieważ mechanizm ten został uprzednio przeze mnie wstępnie przebadany przy zastosowaniu rejestracji wykonanych z obszaru ciała komórkowego (patrz publikacja nr 3).

Rejestracje potencjału błonowego prowadziłem metodą perforowanych łątek (gramicydynową).

Najpierw wykazałem, że agonista receptorów β -adrenergicznych izoproterenol wywołuje depolaryzację w ciele komórkowym neuronów piramidowych kory przedczołowej. Wynik ten zawarty jest również w publikacji nr 3 cyklu, która dotyczy wpływu izoproterenu na prądy jonowe Na^+ . W publikacji nr 3 jednak wszystkie rejestracje prowadziłem w temperaturze

pokojoyej w przeciwieństwie do opisywanej w tym podrozdziale publikacji nr 4, w której temperaturę sztucznego płynu zewnątrzkomórkowego utrzymywałem na poziomie 35 stopni Celsjusza. Amplituda depolaryzacji potencjału błonowego wywołanej przez pobudzenie receptora β -adrenergicznego była mniejsza w temperaturze pokojowej (publikacja nr 3) niż w temperaturze 35 stopni (publikacja nr 4).

Izoproterenol pobudza zarówno receptory β_1 jak i β_2 adrenergiczne. Obserwowana depolaryzacja zależała od aktywacji receptora adrenergicznego typu β_1 ponieważ była blokowana przez antagonistę tego receptora – metoprolol.

Receptory β -adrenergiczne są receptorami metabotropowymi, które kontrolują efekty komórkowe, w tym kanały jonowe, za pośrednictwem kaskady wtórnych przekazników cytoplazmatycznych.

W poprzedniej publikacji nr 3 wykazałem, że depolaryzacja wywołana przez izoproterenol zależy od kanałów typu I_h . W opisywanej w tym podrozdziale publikacji nr 4 potwierdziłem ten wynik. Izoproterenol nie wywoływał depolaryzacji w obecności selektywnego antagonisty kanałów typu I_h . Kanały typu I_h są przewodne dla jonów Na^+ i K^+ . Należy przypuszczać, że rejestrowana depolaryzacja zależy od wzrostu dokomórkowego prądu jonowego Na^+ płynącego przez kanały typu I_h .

Wykazałem, że aktywator cykazy adenylowej forskolina wywołuje depolaryzację w neuronach piramidowych kory przedczołowej podobnie jak izoproterenol. Na podstawie tego wyniku przypuszczałem, że izoproterenol wpływa na potencjał błonowy poprzez aktywację cykazy adenylowej. Również aktywacja receptora β -adrenergicznego nie powodowała zmiany potencjału błonowego w obecności inhibitora cykazy adenylowej (SQ 22536). Jest to dowód na to, że izoproterenol depolaryzuje potencjał błonowy poprzez aktywację cykazy adenylowej. Cyklaza adenylowa powoduje wzrost stężenia wtórnego przekaznika cytoplazmatycznego cAMP w cytoplazmie. W celu ustalenia, czy cAMP wpływa na kanały I_h bezpośrednio czy poprzez aktywację kinazy A zbadano wpływ izoproterenu na potencjał błonowy w obecności inhibitora kinazy A. W tych warunkach agonista receptora β -adrenergicznego wywoływał depolaryzację potencjału błonowego. Amplituda tej depolaryzacji była taka sama jak bez antagonisty kinazy A. Wynika z tego, że kinaza A nie jest zaangażowana w efekt

izoproterenolu na potencjał błonowy. Wynika z tego również, że cAMP najprawdopodobniej wywiera bezpośredni wpływ na kanał typu I_h .

Wszystkie powyższe rejestracje wykonałem z ciała komórkowego neuronów piramidowych kory przedczołowej.

Zbadałem również wpływ izoproterenolu na potencjał błonowy w dendrycie apikalnym neuronów piramidowych kory przedczołowej. W tym celu rozwinąłem w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii WUM metodę rejestracji potencjału błonowego z dendrytów apikalnych metodą łątkową (gramicydynową).

Wprowadziłem procedurę przygotowania skrawków z kory przedczołowej, w których było możliwe uwidocznienie dendrytów w optyce DIC. Otrzymałem trójwymiarowe obrazy dendrytów apikalnych neuronów piramidowych. Są to struktury o średnicy około 1 μM i długości kilkuset μM .

Wykazałem, że pobudzenie receptorów β -adrenergicznych przez izoproterenol wywołuje depolaryzację potencjału błonowego dendrytów apikalnych. Depolaryzacja ta występowała zarówno w odległości między 100 μM a 150 μM od ciała komórkowego jak i w dalszym segmencie dendrytu czyli w odległości między 200 μM a 250 μM od ciała komórkowego.

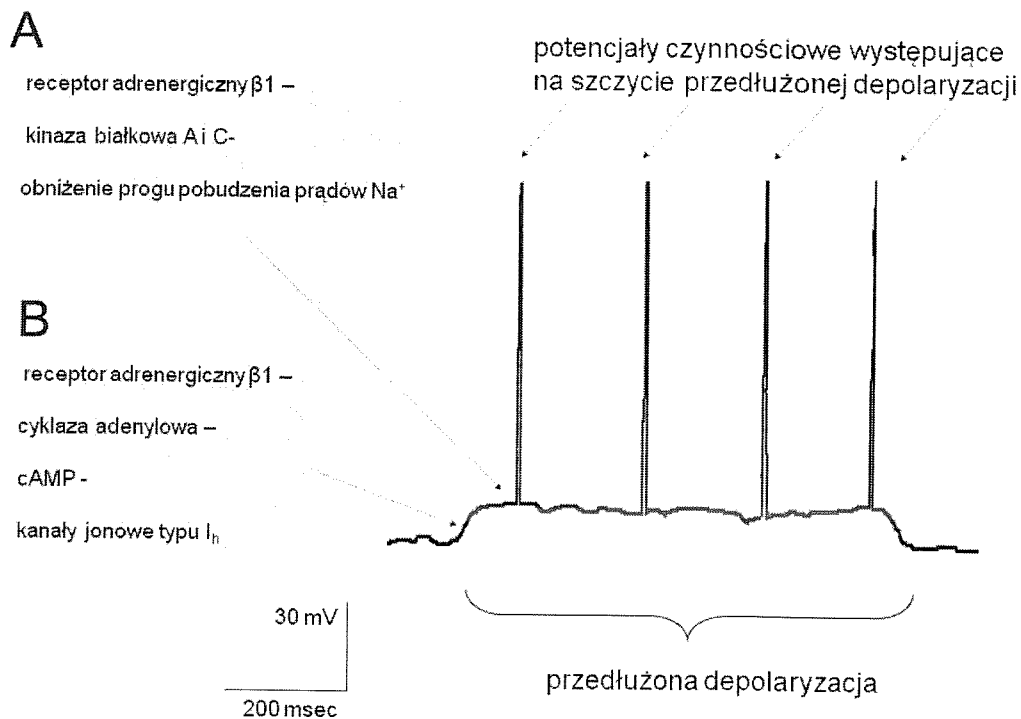
Wykazałem, że wartości potencjału błonowego w obu lokalizacjach w dendrycie i w ciele komórkowym nie różnią się od siebie. Również amplituda depolaryzacji wywołanych przez izoproterenol w obu lokalizacjach w dendrycie nie była statystycznie znamienne różna od depolaryzacji rejestrowanej przez pipetę zlokalizowaną w obszarze ciała komórkowego.

Wnioski z publikacji nr 3 i 4 cyklu

W publikacji nr 3 wykazano, że pobudzenie receptora β -adrenergicznego powoduje obniżenie progu aktywacji dla kanałów jonowych Na^+ . Może to ułatwiać powstawanie potencjałów czynnościowych na szczycie przedłużonych depolaryzacji w neuronach piramidowych kory przedczołowej. W publikacji nr 4 wykazano, że pobudzenie receptora β -adrenergicznego wywołuje podobną depolaryzację błony komórkowej ciała komórkowego i dendrytów apikalnych. Depolaryzacja ta może przyczyniać się do powstawania przedłużonych aktywności badanych neuronów.

Receptor dopaminergiczny typu D1 (publikacja nr 1 i 2) i receptor β -adrenergiczny (publikacja nr 3 i 4) mogą więc wywierać podobny wpływ na przedłużoną aktywność neuronów piramidowych kory przedczołowej.

Hipotezę przedstawiającą wpływ agonisty receptora $\beta 1$ na przedłużoną aktywność neuronów piramidowych kory przedczołowej pokazano na poniższej rycinie 2.



Rycina 2. Wpływ receptorów $\beta 1$ adrenergicznych na potencjał błonowy i próg pobudzenia potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ w neuronach piramidowych kory przedczołowej.

A. Aktywacja receptorów $\beta 1$ adrenergicznych powodowała obniżenie progu pobudzenia kanałów jonowych Na^+ . Przekazywanie sygnału wewnątrzkomórkowego zależało od aktywacji kinazy białkowej A i C. B. Aktywacja receptorów $\beta 1$ adrenergicznych powodowała depolaryzację potencjału błonowego zależną od aktywacji kanałów jonowych typu I_h . W przekazywaniu sygnału wewnątrzkomórkowego pośredniczyła cyklaza adenyłowa i cykliczny AMP.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Osiągnięcia te podzieliłem na okresy przed i po obronie pracy doktorskiej.

Osiągnięcia po obronie pracy doktorskiej (nie należące do cyklu habilitacyjnego):

1. Król M, Ufnal M, **Szulczyk B**, Podsadni P, Drapała A, Turło J, Dawidowski M. (2016) Characterization of Disopyramide derivative ADD424042 as a non-cardiotoxic neuronal sodium channel blocker with broad-spectrum anticonvulsant activity in rodent seizure models. European Journal of Pharmaceutical Sciences 81, 42-51.

IF=3,3 punkty MNiSW=35

W tej pracy zbiorowej, przy pomocy różnych metod, została przebadana substancja o działaniu przeciwdrgawkowym (ADD 424042) zsyntetyzowana w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej WUM. Związkiem wyjściowym do syntezy ADD 424042 był lek antyarytmiczny dyzopiramid. Koncepcja syntezy i jej wykonanie należy do innych autorów publikacji. Działanie przeciwdrgawkowe ADD 424042 zostało wykazane w testach behawioralnych przez inne laboratorium.

Sam wykonałem wszystkie rejestracje prądów Na^+ i potencjałów czynnościowych zawarte w tej publikacji. Jestem również autorem koncepcji tych badań elektrofizjologicznych.

Celem moich doświadczeń było zbadanie wpływu substancji przeciwdrgawkowej o nazwie ADD 424042 na potencjałozależne prądy jonowe Na^+ oraz na potencjały czynnościowe w neuronach piramidowych kory przedczołowej szczurów młodych.

Rejestrowałem prądy jonowe Na^+ metodą stabilizacji potencjału na całej powierzchni błony komórkowej w rozproszonych enzymatycznie i mechanicznie neuronach piramidowych kory przedczołowej.

Najpierw badałem wpływ ADD 424042 na maksymalną amplitudę prądu jonowego Na^+ . Badana substancja przeciwdrgawkowa wywierała nieznaczny wpływ na maksymalną amplitudę prądu jonowego Na^+ przy zhiperpolaryzowanym do -90 mV potencjale błonowym.

Przy fizjologicznym potencjale błonowym -65 mV ADD 424042 silnie i odwracalnie blokował maksymalne prądy jonowe Na^+ .

Następnie badałem wpływ różnych dawek ADD 424042 na prądy jonowe Na^+ .

Przy fizjologicznym potencjale błonowym na poziomie -65 mV badana substancja przeciwdrgawkowa blokowała prądy Na^+ w bardzo niskich stężeniach (IC-50 wynosiło 247 nM). Działanie tak niskich stężeń substancji przeciwdrgawkowych na prądy jonowe Na^+ jest niezwykle rzadko opisywane w literaturze (Ashraf i wsp. 2013).

W dalszej kolejności przebadłem wpływ ADD 424042 na właściwości kinetyczne prądów Na^+ . Badana substancja przeciwdrgawkowa powodowała przesunięcie krzywej aktywacji i krzywej inaktywacji w kierunku hiperpolaryzacji.

Następnie wywoływałem prądy Na^+ z dużą częstotliwością (30 Hz) i obserwowałem spadek amplitudy każdego kolejno wywołanego prądu jonowego Na^+ . Zjawisko to (tzw. use dependent block) było bardziej nasilone w obecności ADD 424042 w porównaniu do rejestracji kontrolnych co może przyczyniać się do działania przeciwdrgawkowego badanej substancji.

W omawianej publikacji badałem również wpływ ADD 424042 na potencjały czynnościowe w neuronach piramidowych w skrawkach kory przedczołowej szczurów młodych. Stosowałem konfigurację elektrofizjologiczną z przebicciem błony komórkowej. Potencjały czynnościowe wywoływałem przy pomocy prostokątnych bodźców depolaryzujących. Pobudliwość definiowałem jako ilość potencjałów czynnościowych rejestrowanych w czasie bodźca depolaryzującego błonę komórkową. Wykazałem, że przy niewielkich bodźcach depolaryzujących ADD 424042 nie wpływa na pobudliwość neuronów. Przy silnych bodźcach depolaryzujących natomiast ADD 424042 zmniejsza pobudliwość neuronów piramidowych kory przedczołowej.

Moje badania wykazały, że molekularny mechanizm działania przeciwdrgawkowego substancji ADD 424042 polega na blokowaniu potencjałozależnych, szybko inaktywujących się prądów jonowych Na^+ . Podobne działanie na prądy Na^+ wywierają powszechnie stosowane leki przeciwpadaczkowe np. fenytoina (Lenkowski i wsp. 2007). Do działania przeciwdrgawkowego badanej substancji może również przyczyniać się zmniejszanie przez nią pobudliwości neuronów. Zaskakującym wynikiem jest stwierdzenie, że badana substancja działała w bardzo niskich, nanomolowych stężeniach.

2. Książek A, Ładno W, **Szulczyk B**, Grzelka K, Szulczyk P. (2013) Properties of BK-type Ca^{++} (+)-dependent K^{+} channel currents in medial prefrontal cortex pyramidal neurons in rats of different ages. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 7, 185.

IF=4,2 punkty MNiSW=30

W tej publikacji scharakteryzowano przy pomocy różnych konfiguracji elektrofizjologicznych właściwości i ekspresję kanałów potasowych typu BK w neuronach piramidowych kory przedczołowej u szczurów w różnym wieku.

Najpierw w neuronach rozproszonych w konfiguracji z przebicciem błony komórkowej (whole-cell voltage-clamp) rejestrowano zsumowane nieinaktywujące się prądy jonowe K^{+} . Zaobserwowano, że selektywny inhibitor kanałów typu BK paksylina zmniejsza amplitudę tych prądów u szczurów młodych i dorosłych natomiast nie wpływa na ich amplitudę u szczurów w okresie dojrzewania. Wynika z tego, że u szczurów w okresie dojrzewania prądy K^{+} typu BK nie były rejestrowane. Wyniki te wskazują na to, że w neuronach piramidowych kory przedczołowej szczurów w okresie dojrzewania kanały BK nie ulegają ekspresji w przeciwieństwie do neuronów szczurów młodych i dorosłych.

Następnie rejestrowano różne podtypy pojedynczych kanałów jonowych K^{+} w neuronach piramidowych kory przedczołowej pobranych od szczurów młodych, w wieku dojrzewania i dorosłych. Wyróżniono następujące podtypy kanałów: kanały jonowe K^{+} zależne od jonów Ca^{++} typu BK, kanały jonowe K^{+} przeciekowe o małej przewodności oraz kanały K^{+} przeciekowe o dużej przewodności. Wykazano, że w neuronach piramidowych pobranych od szczurów w wieku dojrzewania kanały jonowe typu BK były znacznie rzadziej rejestrowane w porównaniu do neuronów pobranych od szczurów młodych i dorosłych. Oznacza to, że szczury w wieku dojrzewania cechowały się niewielką ekspresją kanałów jonowych typu BK.

Wykazano również, że właściwości kinetyczne kanałów jonowych potasowych wapniowo-zależnych typu BK są takie same w badanych trzech grupach wiekowych.

Następnie badano wpływ inhibitora kanałów potasowych typu BK paksyliny na potencjały czynnościowe. Rejestrowano potencjały czynnościowe w skrawkach kory przedczołowej pobranych od szczurów w różnym wieku. Kanały jonowe K^{+} zależne od jonów Ca^{++} typu BK

uczestniczą w repolaryzacji potencjału czynnościowego i w związku z tym ich zablokowanie powoduje poszerzenie potencjału czynnościowego. Wykazano, że inhibitor kanałów jonowych typu BK (paksylina) powoduje rozszerzenie pojedynczego potencjału czynnościowego rejestrowanego w neuronach piramidowych szczurów młodych i dorosłych natomiast nie wykazuje działania na pojedynczy potencjał czynnościowy w neuronach piramidowych pobranych od szczurów w wieku dojrzewania.

Przedstawione dowody wskazują, że neurony piramidowe kory przedczołowej szczurów w okresie dojrzewania nie wykazują ekspresji kanałów typu BK. Kanały te występują w neuronach piramidowych części przyśrodkowej kory przedczołowej szczurów młodych i dorosłych.

Publikacje przed pracą doktorską

W trakcie studiów doktoranckich w Zakładzie Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej WUM zajmowałem się rejestracjami prądów jonowych z neuronów rozproszonych czuciowych i współczulnych. Opisane poniżej publikacje zostały wykonane metodą stabilizacji prądów lub potencjałów na całej powierzchni błony komórkowej (whole cell voltage-clamp i current-clamp). Dwie z nich, dotyczące prądów jonowych Na^+ i K^+ w neuronach współczulnych kontrolnych i po odnerwieniu, były tematem mojej pracy doktorskiej, którą obroniłem z wyróżnieniem.

1. Rola R, Szulczyk B, Szulczyk P, Witkowski G. (2002) Expression and kinetic properties of Na^+ currents in rat cardiac dorsal root ganglion neurons. Brain Research 947, 67-77.

IF=2,4 punkty MNiSW=11

W tej publikacji rejestrowano potencjałozależne prądy jonowe Na^+ i potencjały czynnościowe w funkcjonalnie zidentyfikowanych neuronach czuciowych sercowych. Neurony izolowano ze zwojów przykręgosłupowych szczura i znakowano poprzez uprzednie podanie barwnika fluorescencyjnego do osierdzia. Zdecydowana większość neuronów cechowała się ekspresją zarówno prądu jonowego Na^+ wrażliwego na tetrodotoksynę jak i prądu jonowego Na^+ opornego na tetrodotoksynę. Wykazano, że występują różnice we właściwościach kinetycznych obu typów prądów jonowych Na^+ . Udowodniono również, że potencjały czynnościowe w obecności i nieobecności tetrodotoksyny mają różne właściwości kinetyczne.

Zaobserwowano, że neurony czuciowe sercowe o małej średnicy nie wykazują ekspresji prądów sodowych.

2. Szulczyk P, Rola R, Szulczyk B, Witkowski G. (2002) Neuron czuciowy bólowy. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 56, 361-375.

Punkty MNiSW = 5

Jest to publikacja przeglądowa dotycząca funkcjonowania kanałów jonowych w neuronach czuciowych bólowych.

3. Szulczyk B, Szulczyk P. (2003) Postdecentralization plasticity of voltage-gated Na^+ currents in rat glandular sympathetic neurons. Neuroscience Letters 343, 105-108.

IF= 2,0 punkty MNiSW= 10

W tej publikacji porównano właściwości potencjałozależnych prądów jonowych Na^+ w neuronach współczulnych gruczołowych przed i po ich długotrwałym odnerwieniu. Neurony pobierano ze zwoju szyjnego górnego szczura. Decentralizację wykonywano poprzez przecięcie pnia współczulnego w którym znajdują włókna współczulne przedzwojowe unerwiające badane neurony gruczołowe. Znakowanie neuronów współczulnych gruczołowych wykonywano poprzez nastrzyknięcie ślinianki podżuchwowej barwnikiem fluorescencyjnym. Wykazano, że maksymalna amplituda i gęstość prądów jonowych Na^+ ulegała zwiększeniu po decentralizacji. Ponadto krzywa inaktywacji zależnej od potencjału badanych prądów była przesunięta w kierunku depolaryzacji w neuronach odnerwionych. Prądy jonowe Na^+ ulegały również wolniejszej inaktywacji zależnej od czasu oraz szybszej reaktywacji po decentralizacji.

Wszystkie powyższe zmiany prowadzą do zwiększenia efektywności prądów jonowych Na^+ w neuronach gruczołowych po ich odnerwieniu. Dzięki temu potencjały czynnościowe w neuronach odnerwionych mogą łatwiej powstawać co może przyczyniać się do podtrzymania ich funkcji po odnerwieniu.

4. Szulczyk B, Szulczyk P. (2003) Postdecentralization plasticity of voltage-gated K^+ currents in glandular sympathetic neurons in rats. European Journal of Neuroscience 18, 43-52.

IF = 3,9 punkty MNiSW = 14

W tej publikacji porównano właściwości kinetyczne potencjałozależnych prądów jonowych K^+ w neuronach współczulnych gruczołowych pozazwojowych przed (kontrolnych) i po ich odnerwieniu. Badane neurony były zlokalizowane w zwoju szyjnym górnym. Neurony znakowano znacznikiem fluorescencyjnym podawanym do ślinianki podżuchwowej. Neurony izolowano przez ich rozproszenie enzymatyczne i mechaniczne. W neuronach kontrolnych i odnerwionych, na podstawie różnic we właściwościach kinetycznych i farmakologicznych, wyróżniono trzy typy prądów potasowych: I_{Af} , I_{As} i I_K . Prądy I_{Af} cechowały się szybszą inaktywacją zależną od czasu niż prądy I_{As} natomiast prądy I_K nie inaktywowały się w czasie. W neuronach gruczołowych po ich odnerwieniu gęstość prądów typu I_{Af} i I_{As} była większa niż w neuronach kontrolnych. Ponadto prądy te ulegały szybszej reaktywacji w neuronach odnerwionych. Gęstość prądów typu I_K natomiast zmniejszyła się w neuronach, które zostały odnerwione w porównaniu do neuronów kontrolnych. Odnerwienie wywoływało również zmiany innych właściwości kinetycznych potencjałozależnych prądów jonowych K^+ . Wykazane w tej pracy zwiększenie gęstości prądów K^+ typu I_{Af} i I_{As} może przyczyniać się do zmniejszenia nadmiernej aktywności neuronów gruczołowych po ich odnerwieniu.

5. Szulczyk B, Rola, Witkowski G, Szulczyk P. (2006) Effects of ATP and GTP on voltage-gated K^+ currents in glandular and muscular sympathetic neurons. Brain Research 1068, 82-93.

IF = 2,3 punkty MniSW = 20

W publikacji tej rejestrowano potencjałozależne prądy jonowe K^+ w pozazwojowych neuronach współczulnych po ich rozproszeniu. Badano funkcjonalnie zidentyfikowane neurony unerwiające tkankę gruczołową i mięśniową. Porównywano właściwości prądów potasowych w obecności i przy braku ATP i GTP w płynie wewnątrzkomórkowym w obu typach neuronów. Obniżenie stężenia ATP i GTP występuje w neuronach w czasie hipoksji. Wyróżniono trzy typy potencjałozależnych prądów potasowych I_{Af} , I_{As} i I_K . W neuronach gruczołowych i mięśniowych dodanie ATP i GTP do środowiska wewnątrzkomórkowego powodowało zmniejszenie gęstości prądu typu I_{Af} . Gęstość prądu typu I_{As} była mniejsza w obecności ATP i GTP tylko w neuronach gruczołowych. Gęstość prądu typu I_K natomiast była większa w obecności tych związków w płynie wewnątrzkomórkowym

zarówno w neuronach mięśniowych jak i gruczołowych. Ponadto dodanie ATP i GTP do środowiska wewnątrzkomórkowego zmieniało różne właściwości kinetyczne prądów jonowych K^+ zarówno w neuronach gruczołowych jak i mięśniowych. Opisane różnice mogą przyczyniać się do innego wzorca aktywności w obu typach neuronów współczulnych po usunięciu ATP i GTP ze środowiska wewnątrzkomórkowego.

Osiągnięcia dydaktyczne

Prowadziłem zajęcia z przedmiotu fizjologia człowieka dla studentów I Wydziału Lekarskiego polskojęzycznych i II Wydziału Lekarskiego anglojęzycznych.

Obecnie prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów na kierunku Farmacja i Analityka Medyczna z całego zakresu przedmiotu fizjologia i patofizjologia człowieka.

Od 2003 roku prowadzę ćwiczenia, seminaria i wykłady z fizjologii z następujących zagadnień: fizjologia układu nerwowego (elektrofizjologia, układ czuciowy, ruchowy, wyższe czynności nerwowe), narządy zmysłów, fizjologia serca i naczyń krwionośnych, mechanika i regulacja oddychania, fizjologia nerki, gospodarka wodno-elektrolitowa, fizjologia układu pokarmowego.

Od 2011 roku prowadzę ćwiczenia, seminaria i wykłady z patofizjologii z następujących zagadnień: patofizjologia mięśni poprzecznie prążkowanych, choroby neurodegeneracyjne (choroba Parkinsona, choroba Alzheimera i inne), patofizjologia naczyń krwionośnych (choroba nadciśnieniowa, miażdżycy i inne), patofizjologia serca (choroba wieńcowa, niewydolność serca, zaburzenia rytmu serca, wady serca), patofizjologia układu oddechowego (astma, POCHP i inne), patofizjologia nerek (ostra i przewlekła niewydolność nerek, kłębuszkowe zapalenia nerek i inne).

Byłem opiekunem trzech prac magisterskich na wydziale farmaceutycznym WUM.

Podczas wielu eksperymentów towarzyszyli mi studenci zainteresowani elektrofizjologią mózgu.

Podsumowanie dotychczasowej pracy naukowej

Ilość publikacji pełnotekstowych **11**, w tym 2 jedyne autorstwa i 4 pierwsze autorstwa
zsumowany IF = 27,9, zsumowane punkty MNiSW = 202

liczba cytowań z bazy Web of Science z dnia 24.08.2016, bez autocytowań = **46**
index Hirscha z bazy Web of Science z dnia 24.08.2016 = **4**

Ilość doniesień zjazdowych **16** - konferencje krajowe i międzynarodowe

Poniżej przedstawiam wybrane doniesienia zjazdowe prezentujące osiągnięcia cyklu habilitacyjnego :

Szulczyk B. Szulczyk P. Effect of D1/5 receptor agonists on membrane potential and GIRK channel currents in medial prefrontal cortex (mPFC) pyramidal neurons. 6th Forum of European Neuroscience. Geneva. July 2008.

Szulczyk B. D1 receptor agonist increases the availability of voltage-gated sodium currents in mPFC pyramidal neurons from adult rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2011; 71 (Suplement) : 50. 10th International Congress of the Polish Neuroscience Society. Łódź. September, 2011.

Szulczyk B. β -receptor agonist increases voltage-gated Na^+ currents in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2014; 74 : 335. 9th Conference "Electrophysiological techniques in bioelectricity research : from ion channels to neural networks". Lublin, June 2014.

Szulczyk B. β -adrenergic receptor stimulation depolarizes the membrane potential in the soma and in the dendrite of medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2016; 76. 10th Conference "Electrophysiological techniques in bioelectricity research : from ion channels to neural networks". Kraków, June 2016.

Ilość grantów NCN, w których uczestniczyłem 5

Tytuł projektu : Charakterystyka makroskopowych, potencjało-zależnych prądów jonowych Na^+ i Ca^{++} w neuronach czuciowych współczulnych sercowych. Numer projektu: 4.P05.A.116 19, realizacja w latach 2000-2002, wykonawca

Tytuł projektu : Podstawy neurobiologiczne, mechanizmy i metody profilaktyki oraz leczenia uzależnień. Numer projektu PBZ-KBN-033/P05/2000, realizacja w latach 2001-2004, wykonawca

Tytuł projektu : Kontrola przez dopaminę kanałów (prądów) jonowych typu GIRK w neuronach piramidowych kory przedczołowej. Numer projektu : 2 505A 101 28, realizacja w latach 2005-2008, wykonawca

Tytuł projektu : Udział cAMP w dopaminergicznej kontroli kanałów jonowych Na^+ w neuronach piramidowych kory przedczołowej. Numer projektu : N N401 030037, realizacja w latach 2009-2012, główny wykonawca

Tytuł projektu : Kontrola potencjału błonowego i kanałów jonowych przeciekowych przez receptory adrenergiczne w neuronach piramidowych kory przedczołowej u szczurów w różnym wieku. Numer projektu : N N401 584638, realizacja w latach 2010-2014, wykonawca

Obecnie jestem wykonawcą projektu realizowanego w ramach konsorcjum:

Tytuł projektu : Przyczyny zmienności fenotypowej zespołów padaczkowych uwarunkowanych mutacjami kanału jonowego sodowego Nav1.1. Numer projektu : 2015/17/B/NZ4/02669, realizacja w latach 2016-2019.

Staże naukowe.

W trakcie studiów odbyłem dwa półtoramiesięczne staże w Institute of Molecular Medicine na Uniwersytecie w Oxfordzie. Pracowałem pod kierunkiem profesor Angeli Vincent. Zajmowałem się kanałopatiami autoimmunologicznymi. Pracowałem metodą radioimmunoprecypitacji. Wykrywałem przeciwciała przeciwko receptorowi acetylocholinowemu w surowicy pacjentów z miastenią, przeciwciała przeciwko kanałom jonowym K^+ w surowicy pacjentów z neuromiotonią oraz przeciwciała przeciwko kanałom jonowym Ca^{++} u pacjentów z zespołem Lamberta-Eatona.

Nagrody i wyróżnienia

Zespołowa Nagroda Ministra Zdrowia za cykl prac dotyczących fizjologii Człowieka; funkcjonalnego znaczenia kanałów jonowych w neuronach – rok 2004

Nagroda Zespołowa Naukowa II stopnia rektora WUM za przeprowadzenie badań na poziomie molekularnym neuronów kory przedczołowej odpowiedzialnych za wyższe czynności nerwowe - 2009

Nagroda Zespołowa Naukowa III stopnia rektora WUM za współautorstwo publikacji dowodzącej, że w neuronach kory przedczołowej u osobników młodych, w wieku dojrzewania i dorosłych występuje zmiana ekspresji kanałów jonowych typu BK i typu TREK – rok 2014

Bibliografia

Arnsten AF. (2011) Prefrontal cortical network connections: key site of vulnerability in stress and schizophrenia. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 215-23.

Ashraf MN, Gavrilovici C, Shah SU, Shaheen F, Choudhary MI, Rahman AU, Fahnestock M, Simjee SU, Poulter MO. (2013) A novel anticonvulsant modulates voltage-gated sodium channel inactivation and prevents kindling-induced seizures. *J. Neurochem.* 126, 651–661.

Beltramo R, D'Urso G, Maschio MD, Farisello P, Bovetti S, Clovis Y, Lassi G, Tucci V, Tonelli Davide DeP, Fellin T. (2013) Layer-specific excitatory circuits differentially control recurrent network dynamics in the neocortex. *Nature Neurosci.* 16, 227-234.

Berger T, Larkum ME, Luscher HR. (2001) High $I(h)$ channel density in the distal apical dendrite of layer V pyramidal cells increases bidirectional attenuation of EPSPs. *J. Neurophysiol.* 85, 855-68.

Cantrell AR, Scheuer T, Catterall WA. (1999) Voltage-dependent neuromodulation of Na⁺ channels by D1-like dopamine receptors in rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19, 5301-10.

Crunelli V, Hughes SW. (2010) The slow (<1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. *Nature Neurosci.* 13, 9-17.

Durstewitz D, Seamans JK, Sejnowski TJ. (2000) Dopamine-mediated stabilization of delay-period activity in a network model of prefrontal cortex. *J Neurophysiol.* 83, 1733-50.

Goldman-Rakic PS. (1995) Cellular basis of working memory. *Neuron* 14, 477-485.

Gorelova N, Seamans JK. (2015) Cell-attached single-channel recordings in intact prefrontal cortex pyramidal neurons reveal compartmentalized D1/D5 receptor modulation of the persistent sodium current. *Front. Neural Circuits* 9, 4.

Hains AB, Arnsten AF. (2008) Molecular mechanisms of stress-induced prefrontal cortical impairment: implications for mental illness. *Learn. Mem.* 15, 551-64.

Lenkowski PW, Batts TW, Smith MD, Ko SH, Jones PJ, Taylor CH, McCusker AK, Davis GC, Hartmann HA, White HS, Brown ML, Patel MK. (2007) A pharmacophore derived phenytoin analogue with increased affinity for slow inactivated sodium channels exhibits a desired anticonvulsant profile. *Neuropharmacology* 52, 1044-1054.

Maurice N, Tkatch T, Meisler M, Sprunger LK, Surmeier DJ. (2001) D1/D5 dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 21, 2268-77.

Petersen CCH, Hahn TTG, Mehta M, Grinvald A, Sakmann B. (2003) Interaction of sensory responses with spontaneous depolarization in layer 2/3 barrel cortex. *PNAS* 100, 13638-13643.

Plakke B, Hwang J, Romanski LM. (2015) Inactivation of primate prefrontal cortex impairs auditory and audiovisual working memory. *J. Neurosci.* 35, 9666-75.

Ramos BP, Colgan L, Nou E, Ovadia S, Wilson SR, Arnsten AF. (2005) The beta-1 adrenergic antagonist, betaxolol, improves working memory performance in rats and monkeys. *Biol Psychiatry* 58, 894-900.

Roberts BM, Seymour PA, Schmidt CJ, Williams GV, Castner SA. (2010) Amelioration of ketamine-induced working memory deficits by dopamine D1 receptor agonists. *Psychopharmacology (Berl)*. 210, 407-18.

Trivedi JK. (2006) Cognitive deficits in psychiatric disorders: Current status. *Indian J Psychiatry.* 48, 10-20.

Tseng KY, Mallet N, Toreson KL, Le Moine C, Gonon F, O'Donnell P. (2006) Excitatory response of prefrontal cortical fast-spiking interneurons to ventral tegmental area stimulation in vivo. *Synapse* 59, 412-7.

Tseng KY, O'Donnell P. (2005) Post-pubertal emergence of prefrontal cortical up states induced by D1-NMDA co-activation. *Cerebral Cortex* 15, 49-57.

B. Szulczyk