

MAŁGORZATA TROCHA
KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOLOGII
UNIwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
WROCLAW

AUTOREFERAT



WROCLAW 2014

SPIS TREŚCI:

| | |
|--|----|
| 1. Imię i Nazwisko..... | 3 |
| 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej..... | 3 |
| 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych..... | 3 |
| 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. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 ze zm.)..... | 5 |
| A. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego..... | 5 |
| B. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa..... | 5 |
| C. Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania..... | 6 |
| 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)..... | 22 |
| 6. Pozostałe informacje..... | 28 |
| A. Podsumowanie dorobku naukowego..... | 28 |
| B. Udział w konferencjach naukowych..... | 28 |
| C. Udział w projektach badawczych..... | 30 |
| D. Patenty i zgłoszenia patentowe..... | 31 |
| E. Szkolenia i kursy..... | 32 |
| F. Recenzowanie publikacji w czasopismach..... | 32 |
| G. Działalność dydaktyczna..... | 32 |
| H. Działalność w komitetach organizacyjnych..... | 33 |
| I. Działalność w zawodzie lekarza..... | 33 |
| J. Członkostwo w krajowych i europejskich towarzystwach naukowych..... | 33 |
| K. Nagrody i wyróżnienia..... | 33 |

1. **IMIĘ I NAZWISKO:** Małgorzata Trocha2. **POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE** (nazwa, miejsce i rok uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej)

- 1997 – Dyplom lekarza z wyróżnieniem (Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wydział Lekarski, Wrocław).
- 2005 – Stopień doktora nauk medycznych (Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wydział Lekarski, rozprawa doktorska pt.: **Wpływ leków blokujących kanały wapniowe na wątrobę szczurzą przechowywaną do przeszczepienia.** promotor dr hab. n. med. Adam Szelaąg, prof. nadzw.; Katedra i Zakład Farmakologii Akademii Medycznej we Wrocławiu. Wrocław, 2004; 126 k.).
- 2006 – Tytuł specjalisty w dziedzinie: choroby wewnętrzne.
- 2011 – Tytuł specjalisty w dziedzinie: hipertensjologia.

3. **INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

- 1995-1997 Praca w charakterze wolontariusza w Klinice Chorób Wewnętrznych i Zawodowych Akademii Medycznej we Wrocławiu (podczas studiów lekarskich).
- 1997-1998 Staż podyplomowy w Samodzielnym Państwowym Szpitalu Klinicznym Nr 1 we Wrocławiu.
- 1998-2005 Praca naukowo – badawcza i dydaktyczna w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Akademii Medycznej we Wrocławiu na stanowisku asystenta.
- 2000-2006 Kształcenie specjalizacyjne z chorób wewnętrznych w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego Akademii Medycznej we Wrocławiu.
- Od 2005 Praca naukowo – badawcza i dydaktyczna w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Akademii Medycznej we Wrocławiu na stanowisku adiunkta.
- 2009-2011 Kształcenie specjalizacyjne z hipertensjologii w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Po ukończeniu z wyróżnieniem studiów na kierunku lekarskim Akademii Medycznej we Wrocławiu, po konkursie, rozpoczęłam pracę jako asystent w Katedrze i Zakładzie Farmakologii.

W tym czasie uzyskałam tytuły specjalisty z zakresu chorób wewnętrznych oraz hipertensjologii w Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego AM we Wrocławiu.

Od początku pracy moje zainteresowania naukowe były powiązane z działalnością kliniczną, w której na co dzień miałam do czynienia z pacjentami z zaburzeniami narządów spowodowanymi przez różne substancje toksyczne.

Początkowo badałam wpływ różnych czynników szkodliwych na czynność wątroby i możliwości jej ochrony, z wykorzystaniem modelu perfuzji pozaustrojowej wątroby szczurzej. Opanowałam trudną technicznie metodykę eksperymentu, a efektem pracy były wyniki badań, które zostały zawarte między innymi w mojej rozprawie doktorskiej, przedstawione w kilku pracach oryginalnych opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, w postaci doniesień zjazdowych, a także były inspiracją dla kilku prac poglądowych.

W następnych latach w badaniach eksperymentalnych wykorzystywałam model niedokrwienia i reperfuzji wątroby w warunkach *in vivo*. Badałam potencjalne działanie ochronne na wątrobę różnych związków: leków blokujących kanały wapniowe, w tym pochodnych dihydropirydynowych, flawonoidów, statyn i ezetymibu. W tym czasie badałam także wpływ innych czynników, np. wieku wątroby na jej sprawność podczas niedokrwienia i reperfuzji; ostatnio poszukuję właściwości plejotropowych sitagliptyny.

W większości przeprowadzonych badań, w szczególności analizowałam układ oksydoredukcyjny w wybranych narządach oraz stan i sprawność przemian szlaku: ADMA-DDAH-NO. Do przeprowadzenia tych badań konieczne było opracowanie w naszym zakładzie i wdrożenie do praktyki, metod oznaczania poszczególnych parametrów stresu oksydacyjnego, syntaz tlenu azotu oraz aktywności dimetyloaminohydrolazy dimetyloargininy (DDAH) – enzymu metabolizującego asymetryczną dimetyloargininę (ADMA) a także, we współpracy, z Kliniką Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego, metod oznaczania stężenia argininy i jej pochodnych, a we współpracy z Katedrą i Zakładem Histologii i Embriologii metod badania ekspresji mRNA dla DDAH oraz PRMT (metylotransferazy argininowej).

Wyniki przeprowadzonych badań, opublikowane w renomowanych czasopiśmie z listy filadelfijskiej, poszerzają naszą wiedzę o nowe, dotychczas nieznanne lub mało znane właściwości powszechnie stosowanych leków, które ujawniają się i nabierają praktycznego znaczenia dopiero w warunkach niedokrwienia i reperfuzji wątroby.

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:

Badania stresu oksydacyjnego i szlaku ADMA-DDAH-NO w modelach doświadczalnych niedokrwienia i/lub reperfuzji wątroby

B. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

- 1) Trocha M, Szelağ A, Pieśniewska M, Fereniec-Gołębiowska L, Grotthus B, Merwid-Ląą A (2007): Effect of aging process on liver function in extracorporeal rat liver perfusion. *Hepato-Gastroenterology* 2007, 54(76), 1207-1211; IF: 0,904; Pkt. MNiSW/KBN: 15

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: zaprojektowaniu doświadczenia, koordynacji części doświadczalnej, obserwacji zwierząt, analizie statystycznej otrzymanych wyników, przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- 2) Trocha M, Merwid-Ląą A, Chlebda-Sieragowska E, Szuba A, Pieśniewska M, Fereniec-Gołębiowska L, Kwiatkowska J, Szelağ A, Sozański T: Age-related changes in ADMA-DDAH-NO pathway in rat liver subjected to partial ischemia followed by global reperfusion. *Exp Gerontology*, praca zaakceptowana do druku DOI 10.1016/j.exger.2013.11.004; IF: 3,911; Pkt. MNiSW/KBN: 35

Wkład własny: zaprojektowanie doświadczenia, koordynacja części doświadczalnej, obserwacja zwierząt, udział w zabiegu niedokrwienia i reperfuzji wątroby, izolacja wątroby, pobieranie krwi w trakcie doświadczenia, analiza statystyczna otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

- 3) Trocha M, Merwid-Ląą A, Chlebda E, Sozański T, Magdalan J, Pieśniewska M, Fereniec-Gołębiowska L, Gliniak H, Szelağ A: Influence of simvastatin on oxido-redox status and nitric oxide synthases protein concentration in rat liver subjected to "cold" ischemia. *Adv Clin Exp Med* 2010, 19(1), 43-50; IF: 0,103; Pkt. MNiSW/KBN: 13

Wkład własny: zaprojektowanie doświadczenia, koordynacja części doświadczalnej, obserwacja zwierząt, pobieranie krwi z żyły ogonowej, analiza statystyczna otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

- 4) Trocha M, Merwid-Ląą A, Chlebda E, Pieśniewska M, Sozański T, Szelağ A: Effect of simvastatin treatment on rat livers subjected to ischemia/reperfusion. *Pharmacol Rep* 2010, 62 (4), 757-762; IF: 2,5; Pkt. MNiSW/KBN: 20

Wkład własny: zaprojektowanie doświadczenia, koordynacja części doświadczalnej, obserwacja zwierząt, udział w zabiegu niedokrwienia i reperfuzji wątroby, izolacja wątroby,

pobieranie krwi w trakcie doświadczenia, analiza statystyczna otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- 5) **Trocha M**, Merwid-Ląd A, Szuba A, Chlebda E, Pieśniewska M, Sozański T, Szelağ A: Effect of simvastatin on nitric oxide synthases (eNOS, iNOS) and arginine and its derivatives (ADMA, SDMA) in ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Pharmacol Rep* 2010, 62(2), 343-351; IF: 2,5; Pkt. MNiSW/KBN: 20

Wkład własny: zaprojektowanie doświadczenia, koordynacja części doświadczałnej, obserwacja zwierząt, udział w zabiegu niedokrwienia i izolacji wątroby, pobieranie krwi w trakcie doświadczenia, analiza statystyczna otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

- 6) **Trocha M**, Merwid-Ląd A, Chlebda E, Sozański T, Pieśniewska M, Gliniak H, Szelağ A: Influence of ezetimibe on selected parameters of oxidative stress in rat liver subjected to ischemia/reperfusion. Praca zaakceptowana do druku w AMS. DOI: 10.5114/aoms.2013.38087; IF: 1,067; Pkt. MNiSW/KBN: 20

Wkład własny: zaprojektowanie doświadczenia, koordynacja części doświadczałnej, obserwacja zwierząt, udział w zabiegu niedokrwienia i reperfuzji wątroby, izolacja wątroby, pobieranie krwi w trakcie doświadczenia, analiza statystyczna otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

- 7) **Trocha M**, Merwid-Ląd A, Sozański T, Chlebda-Sieragowska E, Szuba A, Dziegiel P, Pieśniewska M, Fereniec-Gołębiewska L, Kwiatkowska J, Gomułkiewicz A, Cwynar-Zajac Ł, Brykner R, Szelağ A: Influence of ezetimibe on ADMA-DDAH-NO pathway in rat liver subjected to partial ischemia followed by global reperfusion. *Pharmacol Rep* 2013, 65 (1), 122-133; IF: 1.965; Pkt. MNiSW/KBN: 25

Wkład własny: zaprojektowanie doświadczenia, koordynacja części doświadczałnej, obserwacja zwierząt, udział w zabiegu niedokrwienia i reperfuzji wątroby, izolacja wątroby, pobieranie krwi w trakcie doświadczenia, analiza statystyczna otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

Sumaryczny IF: 12,950

Punkty MNiSW/KBN: 148

C. Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Przeszczepianie wątroby jest metodą z wyboru w leczeniu ciężkiej niewydolności tego narządu. W ostatnich latach liczba tych zabiegów stale rośnie. W Stanach Zjednoczonych Ameryki przeprowadza się rocznie ok. 3000 takich zabiegów, a w Polsce ponad 240, przy czym, coraz częściej przeszczepiane są narządy pochodzące od dawców w wieku powyżej 50 roku życia, co wydaje się naturalną konsekwencją starzejącego się społeczeństwa. Czynność takiej wątroby jest prawidłowa, ale jest ona bardziej wrażliwa na warunki niedokrwienia i reperfuzji

(IR), a ryzyko wystąpienia niewydolności takiego narządu po przeszczepieniu jest większe niż wątroby pochodzącej od młodszych dawców. Wiadomo także, że w społeczeństwie europejskim zwiększa również liczba osób otyłych i pacjentów z hiperlipidemią. Przykładowo 2/3 populacji w Wielkiej Brytanii ma podwyższone stężenie cholesterolu i tylko 10% tego społeczeństwa ma prawidłowe wartości LDL. Biorąc pod uwagę rygorystyczne wartości odcięcia dla pacjentów tzw. dużego i bardzo dużego ryzyka sercowo-naczyniowego, z dużym prawdopodobieństwem możemy stwierdzić, że wśród potencjalnych dawców przeszczepu, będą osoby przewlekle leczone statynami w monoterapii lub w połączeniu, np. z ezetymibem. Ocena czynności wątroby zależy od wieku, a także poznanie i/lub wykazanie ochronnego działania leków hipolipemizujących na narządy poddane IR, może mieć nie tylko znaczenie poznawcze przez rozszerzenie naszej wiedzy w tym zakresie, ale też praktyczne z możliwością zastosowania klinicznego.

Niedokrwienie i reperfuzja wątroby

Niedokrwienie i reperfuzja uważane są za główną przyczynę uszkodzenia poszczególnych organów w różnych stanach patologicznych. Te, niekorzystne dla wątroby, procesy zachodzą między innymi podczas zabiegu przeszczepiania wątroby oraz podczas częściowej hepatektomii. Przeszczepianie wątroby jest powszechnie przyjętą metodą leczenia przewlekłej i ostrej niewydolności tego narządu. Przed rozpoczęciem czynności przeszczepienia, wątroba jest przechowywana w odpowiednim płynie w niskiej temperaturze (7°C). Jest to etap, w którym dochodzi do tzw. „niedokrwienia zimnego” tego narządu. W kolejnym etapie, aby narząd mógł być przeszczepiony do organizmu biorcy, musi zostać stopniowo ogrzany. Uszkodzenie wątroby w tych warunkach jest wywołane przez tzw. „niedokrwienie ciepłe”. W dalszym etapie uszkodzenie wątroby nasila się podczas wznowienia perfuzji krwi przez ten narząd (reperfuzja). W patogenezie uszkodzenia wywołanego przez IR bierze udział wiele czynników, dlatego jest ona niezwykle złożona i nadal nie do końca poznana. We wczesnej, ostrej fazie (w ciągu pierwszych 3-6 godzin reperfuzji) dominuje nasilony stres oksydacyjny, dochodzi do wzmożonej produkcji wolnych rodników tlenowych, tlenku azotu, oraz aktywacji limfocytów T i komórek Browicza-Kupffera. W fazie podostrej (18-24 godziny reperfuzji) można zaobserwować naciekanie limfocytów i nasiloną produkcję cytokin prozapalnych, chemokin i prooksydantów. Od stopnia uszkodzenia komórki wątrobowej, nasilenia procesów zapalnych i stresu oksydacyjnego zależy jej prawidłowa czynność po zabiegu.

Stres oksydacyjny

Podczas niedokrwienia i reperfuzji wzmożona produkcja wolnych rodników tlenowych (ROS) nie jest równoważona przez antyoksydanty. Oksydaza NADPH, oksydaza ksantynowa, mieloperoksydaza oraz malonodialdehyd (MDA) i nadtlarki lipidów (LPO) są głównymi wskaźnikami stresu oksydacyjnego. Do antyoksydantów, odpowiedzialnych za ochronę tkanek przed szkodliwym działaniem prooksydantów, należą różne enzymy, a wśród nich dysmutaza ponadtlarkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (PGx) czy katalaza (CAT) jak również związki nieenzymatyczne, do których należy glutation (GSH). SOD przekształca rodnik ponadtlarkowy do nadtlarku wodoru (H₂O₂) i tlenu. W następnym etapie H₂O₂ i nadtlarki lipidów, także będące wskaźnikami nasilenia stresu oksydacyjnego, przy udziale PGx – enzymu

zawierającego selen, ulegają redukcji do alkoholi i wody. Dodatkowo, CAT, bardzo aktywny enzym antyoksydacyjny obecny głównie w peroksysomach, katalizuje reakcję H_2O_2 do tlenu cząsteczkowego i wody. Stopień uszkodzenia komórek wątroby przechowywanej do przeszczepienia zależy m.in. od nasilenia stresu oksydacyjnego wyrażonego zachwianiem równowagi pomiędzy wskaźnikami pro- i antyoksydacyjnymi. Dlatego wydaje się, że leki, które posiadają właściwości antyoksydacyjne, mogłyby działać w tych warunkach hepatoprotekcyjnie.

ADMA-DDAH-NO

Synteza tlenu azotu (NO) jest kluczowa dla utrzymania wielu ważnych fizjologicznych funkcji organizmu. NO, produkowany stale w niewielkich ilościach przez konstytutywny enzym: śródbłonkową syntazę tlenu azotu (eNOS), odpowiada za utrzymanie napięcia ściany zatok oraz przepływ krwi w wątrobie. Wywołuje on relaksację komórek gwiazdzystych, m.in. przez aktywację cykazy guanylowej. Dysfunkcja szlaków metabolicznych zależnych od NO może istotnie zwiększać ryzyko uszkodzeń narządowych, stanowiąc jednocześnie ważne ogniwo patogenezy, m.in. nieprawidłowej funkcji wątroby poddanej niedokrwieniu i reperfuzji.

Podczas metylacji argininy powstają: asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) i monometyloarginina (L-NMMA), które hamują aktywność wszystkich izoform syntaz tlenu azotu oraz symetryczna dimetyloarginina (SDMA). Stężenie ADMA wzrasta w różnych stanach patologicznych powodując spadek produkcji NO i dysfunkcję śródbłonka. Poziom ADMA rośnie m.in. w warunkach stresu oksydacyjnego, m.in. w chorobach takich, jak: hipercholesterolemia, hiperglikemia, hiperhomocysteinemia, choroba wieńcowa, niewydolność serca i udar. Wszystkim tym stanom towarzyszy 2 a nawet 4-krotny wzrost stężenia ADMA w surowicy krwi, zahamowanie syntezy NO i dysfunkcja śródbłonka. Upośledzona funkcja wątroby, narządu odpowiedzialnego za wydalanie ADMA, również wpływa na wzrost stężenia tego związku w organizmie. U pacjentów poddanych resekcji wątroby wykazano podwyższone stężenie ADMA w okresie pooperacyjnym, zwłaszcza, gdy współistniała upośledzona funkcja wątroby.

Z drugiej strony sugeruje się, że ADMA może odgrywać ważną rolę w regulacji nadmiernej syntezy NO poprzez hamowanie indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS).

Stężenie ADMA zależy przede wszystkim od aktywności 2 enzymów: N-metylotransferazy argininowej (PRMT) typu 1 (PRMT1), która syntetyzuje ten związek oraz dimetyloaminohydrolazy dimetyloargininy (DDAH), która go metabolizuje. Na stężenie ADMA wpływają także argininaza – enzym rozkładający argininę do mocznika i ornityny, a także sprawność systemów transportujących, zlokalizowanych w sąsiedztwie miejsc wiązania eNOS i kalweoliny (tzw. kationowy transporter aminokwasów – CAT). To sugeruje zależność między aktywnością transportera a dostępem substratu dla syntazy. PRMT występuje w dwóch formach: typ 1 odpowiada za syntezę ADMA, typ drugi – SDMA. Oba katalizują syntezę L-NMMA. DDAH obecna jest przede wszystkim w wątrobie. Rozkład ADMA zachodzi w komórkach śródbłonka i hepatocytach. Ssaki posiadają dwie izoformy DDAH, przy czym za regulację stężenia ADMA we krwi i tkankach odpowiada przede wszystkim izoforma typu 1. Zwiększenie stężenia ADMA – poprzez, albo zwiększenie jej syntezy albo zmniejszenie jej metabolizmu, występuje między innymi w stresie oksydacyjnym.

Nie tylko zwiększenie stężenia ADMA, zmniejszenie aktywności DDAH i zwiększenie aktywności PRMT świadczą o zaburzeniu syntezy tlenku azotu (NO). Istotnym czynnikiem zaburzającym produkcję tego związku jest zmniejszenie aktywności syntazy NO (NOS). Głównym substratem dla NOS jest L-arginina. Niedobór argininy powoduje zmniejszenie syntezy NO. Co ciekawe, z badań *in vitro* wynika, że podanie L-argininy może hamować aktywność DDAH – z siłą zależną od dawki – konkurując z ADMA o miejsce wiązania w centrum aktywnym syntazy NO. W warunkach niedoboru argininy lub kofaktora dla eNOS – tetrahydrobiopteryny (BH₄), eNOS przybiera formę niezłączoną (*uncoupled*). Zahamowanie eNOS w warunkach stresu oksydacyjnego związane jest ze szkodliwym działaniem peroksynitrytu, który może utleniać BH₄ do nieaktywnej dihydropteryny (BH₂) lub też bezpośrednio działa niekorzystnie na eNOS, utleniając połączenia cynku z grupami SH. Powoduje to uwolnienie cynku z enzymu i przejście eNOS w postać niezłączoną. W tym stanie elektrony przepływające z domeny reduktazy na oksydazę są kierowane w kierunku tlenu cząsteczkowego, a nie argininy, co skutkuje produkcją nadtlenu, a nie NO.

W warunkach fizjologicznych NO produkowany jest w małych ilościach przez eNOS, i odpowiada za utrzymanie prawidłowego napięcia ściany naczyń. W warunkach IR, NO produkowany w dużych ilościach przede wszystkim przez izoformę iNOS, uważany jest za jeden z ważniejszych czynników patogenetycznych uszkodzeń narządowych. W reakcji NO z wolnymi rodnikami tlenowymi powstaje toksyczny peroksynitryt. Wzrost stężenia ADMA endogennego kompetycyjnego inhibitora syntazy NO, również przyczynia się do powstania uszkodzeń w danym narządzie. Wykazano, że ADMA, niezależnie od zmniejszania ilości NO i powodowania następowego skurczu naczyń, zwiększa dodatkowo ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję cząstek adhezyjnych. Prowadzi to do wzrostu ekspresji białka chemotaktycznego typu 1 dla monocytów (MCP-1), które z kolei może być hamowane m.in. przez argininę.

Na stężenie NO w niedokrwionej wątrobie wpływa wiele czynników, między innymi: niedobór tlenu, obniżone stężenie NADPH i tetrahydrobiopteryny, zwiększenie aktywności argininy, a także zwiększone uwalnianie inhibitorów NOS w czasie reperfuzji. Nasiloną metylacja białek w uszkodzonej wątrobie służy usuwaniu zmienionych białek. Wykazano, że aktywność proteaz koreluje ze sprawnością przeszczepionego narządu. Spadek aktywności DDAH w stresie oksydacyjnym prowadzi do zwiększenia stężenia ADMA. Istnieje związek pomiędzy stężeniem metylowych pochodnych argininy a sprawnością czynnościową wątroby po przeszczepieniu. Dlatego leki modyfikujące przemianę NO w niedokrwionej wątrobie mogą wpływać na wydolność przeszczepionej wątroby.

Proces starzenia się organizmu

Proces starzenia się jest zjawiskiem złożonym, które związane jest z utratą zdolności organizmu do sprawnego funkcjonowania w warunkach stresu, a tym samym wiąże się z większą skłonnością do zapadania na różne choroby, co w konsekwencji prowadzi do jego śmierci. W tym sensie można powiedzieć, że jest to naturalny proces, który stopniowo kończy każde życie. Stopniowa, ale stale postępująca, utrata zdolności do utrzymania homeostazy prowadzi do gromadzenia się w organizmie białek i tłuszczów o innej, zmienionej budowie. Obecność takich nieprawidłowych białek jest znana i opisana w: cukrzycy, miażdżycy naczyń

tętnicznych, chorobie Alzheimerera i chorobie Parkinsona. W miarę trwania życia dochodzi również do m.in.: zaburzeń w wydzielaniu hormonów, osłabienia odpowiedzi immunologicznej, utraty masy kostnej, a także do zwiększonej podatności organizmu na niekontrolowany rozwój różnych komórek i tkanek, czyli powstawanie nowotworów. Zwiększa się także zapadalność na choroby zapalne, a także, częściej niż u młodych, pojawiają się zaburzenia w gospodarce lipidowej.

Wątroba jest tak ważnym dla życia narządem, że długo zachowuje swoją sprawność, a często wykonywane testy diagnostyczne – oznaczanie stężenia albumin, aminotransferaz, lipoprotein o dużej gęstości – nie wykazują odchyżeń od normy u ludzi starszych. Jednak, również w wątrobie, podobnie jak w innych narządach, proces starzenia powoduje powstanie pewnych zmian czynnościowych i strukturalnych. Z wiekiem maleje, np.: wielkość wątroby, bo zmniejsza się przepływ krwi przez ten narząd. Obserwujemy tzw. brązowy zanik wątroby, który związany jest z odkładaniem się lipofuscyny w hepatocytach. W procesie starzenia zmniejsza się liczba mitochondriów, ale ich objętość przy tym wzrasta. Nie zmienia się natomiast aktywność enzymów mitochondrialnych. Zmniejsza się ilość siateczki śródplazmatycznej szorstkiej. U starszych pacjentów upośledzone jest wydzielanie żółci i kwasów żółciowych, przynajmniej częściowo związane z zahamowaniem transportu aktywnego. Zmniejsza się również produkcja białek szoku termicznego i innych białek powstających w warunkach stresu, pełniących rolę ochronną i odpowiadających za niezwykłą zdolność wątroby do regeneracji. Wraz z wiekiem wzrasta stężenie lipidów w surowicy i gromadzi się dolichol – lipid błonowy o zmienionej budowie. Prowadzi to do zmian w strukturze błon komórkowych i zwiększenia ich wrażliwości na stres oksydacyjny. W proces starzenia zaangażowane są wolne rodniki tlenowe, które produkowane w mitochondriach uszkadzają mitochondrialne DNA. Wzrasta stężenie anionu nadtlenowego, nadtlenu wodoru oraz rodników hydroksylowych zaangażowanych w powstanie wielu zmienionych białek w starzejącej się wątrobie. Zwiększa się stężenie nadtlenu lipidów, a zmniejsza ilość GSH. Z drugiej strony w miarę trwania życia, maleje aktywność SOD, CAT i GPx. Zmniejsza się sprawność metaboliczna wątroby, w tym aktywność wielu izoenzymów cytochromu P450.

Wykazano, że wątroby pochodzące od ludzi starszych są bardziej wrażliwe na działanie niedokrwienia i reperfuzji, co może być przyczyną większej śmiertelności obserwowanej w grupie pacjentów z przeszczepionymi takimi wątrokami. Co prawda, niektórzy sugerują dobrą zdolność do regeneracji wątroby od starszych pacjentów, np. po częściowej hepatektomii czy nawet przeszczepieniu, to jednak te obserwacje są w mniejszości, bo coraz więcej badań długoterminowych, wskazuje, że czas przeżycia biorców zależy od wieku dawcy. Im młodszy dawca tym czas przeżycia dłuższy i odwrotnie.

W badaniach wykazano wiele zmian powstających w warunkach IR zależnych od wieku wątroby. Obserwowano nasilenie objawów stresu oksydacyjnego związane przede wszystkim ze zmniejszeniem produkcji antyoksydantów. Wraz z wiekiem zwiększa się odpowiedź zapalna, mierzona zwiększeniem stężenia cytokin prozapalnych, ekspresji genów dla czynników prozapalnych i obniżeniem ekspresji mRNA dla czynników przeciwzapalnych. W starszej wątrobie w odpowiedzi na IR występuje zwiększone uszkodzenie tkanek (wzrost aktywności aminotransferaz, gromadzenie się i aktywacja neutrofilii), a także obniżenie ekspresji białka cytoprotekcyjnego (HSP70) i zdolności regeneracyjnej wątroby.

Nasza wiedza na temat zmian, jakie zachodzą w wątrobie w wyniku IR jest jednak niepełna, niewiele wiemy, np. na temat wpływu procesu starzenia się wątroby na szlak NO w warunkach IR.

Leki hipolipemizujące

Inhibitory reduktazy 3-hydroksymetyloglutarylo-CoA (statyny) są lekami obniżającymi stężenie lipidów we krwi. Duże znaczenie w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych ma także ich działanie niezwiązane z zasadniczym mechanizmem działania (plejotropowe). Jest to m.in. wpływ na produkcję tlenku azotu, właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne. Wydaje się jednak, że nie można w tym przypadku mówić o efekcie klasy. Właściwości antyoksydacyjne zależą m.in. od budowy chemicznej, obecności aktywnych metabolitów i właściwości fizykochemicznych poszczególnych leków z tej grupy i nie mają związku z siłą hamowania reduktazy HMG-CoA. Wiele badań sugeruje właściwości antyoksydacyjne fluwastatyny czy rozuwastatyny. Wyniki badań z popularną simwastatyną są niejednoznaczne. Dodatkowo, leki z tej grupy wykazują zależne od dawki działanie hepatotoksyczne.

Ezetymib jest nowym lekiem hipolipemizującym, należącym do 2-azetydynonów. Mechanizm działania ezetymibu polega na hamowaniu wchłaniania cholesterolu w rąbku szczoteczkowym nabłonka jelit. Wiąże się on ze specyficznym białkiem (tzw. białkiem Niemann-Picka NPC1L1) pośredniczącym w śródkomórkowym transporcie cholesterolu w komórkach nabłonkowych rąbka szczoteczkowego początkowego odcinka jelita czczego. Lek ten również wpływa na syntezę NO oraz na układ oksydo-redukcyjny, jednak dane na ten temat są skąpe, a wyniki tych badań często niejednoznaczne. Jednocześnie wydaje się, że lek ten jest względnie bezpieczny i jak dotąd nie pojawiły się jedynie pojedyncze doniesienia o uszkodzeniu wątroby.

Celem badań niniejszego cyklu publikacji były ocena wybranych parametrów stresu oksydacyjnego i szlaku ADMA-DDAH-NO w wątrobie szczurzej w warunkach niedokrwienia i reperfuzji, po podaniu leków hipolipemizujących – simwastatyny i ezetymibu, oraz w zależności od wieku zwierząt.

Badania przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar, w wieku 3-4 miesięcy lub 11-14 miesięcy – w przypadku badań nad wpływem wieku na czynność wątroby. W doświadczeniach czynność wątroby badana była w modelu perfuzji pozaustrojowej (praca nr 1), lub *in vivo* w warunkach niedokrwienia i reperfuzji (prace nr 2, 4-7), jak również w modelu „niedokrwienia zimnego” (praca nr 3). W pierwszym modelu, po uśpieniu zwierząt wątrobę wyizolowano i podłączono do aparatu do perfuzji pozaustrojowej (*extracorporeal liver perfusion* – ELP Universal Perfusion System UNIPER UP-100 (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH). „Niedokrwienie zimne” uzyskano przechowując wątroby w 7°C przez 24 godziny. W najtrudniejszym modelu IR zwierzęta usypiano (ketamina, medetomidyna i butorfanol), a następnie otwierano jamę brzuszną za pomocą cięcia środkowego. Następnie wątrobę wyizolowano. „Niedokrwienie ciepłe” wywoływano przez założenie klipsów naczyniowych na tętnicę wątrobową oraz gałąź żyły wrotnej, zaopatrującą lewy płat boczny i śródowy wątroby. Reperfuzja rozpoczynała się po zdjęciu klipsów naczyniowych. W czasie reperfuzji, jamę brzuszną zamykano i obserwowano zachowanie się zwierząt. Zarówno w czasie perfuzji pozaustrojowej, jak i podczas reperfuzji *in vivo*, pobierano odpowiednio płyn

perfuzyjny lub krew, w których oznaczano badane parametry. Badano aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i asparaginianowej (AST), stężenia glukozy, ADMA, SDMA i argininy oraz ilość produkowanej żółci. Po tym okresie wątrobę zabezpieczano celem wykonania oznaczeń stresu oksydacyjnego, stężenia białka enzymatycznego syntaz NO oraz aktywności DDAH. W jednym z doświadczeń badano dodatkowo ekspresję mRNA dla DDAH i PRMT1.

Badania funkcji wątroby w czasie perfuzji pozaustrojowej oraz w warunkach IR *in vivo* wykazały zmiany zależne od wieku. Natomiast porównanie wpływu leków hipolipemizujących na badane parametry w wątrobach poddanych IR z odpowiednimi wartościami w wątrobach bez IR wykazały nowe właściwości leków, których nie można wykazać w innych warunkach doświadczalnych.

Badania zostały przeprowadzone na zwierzętach zdrowych, bez hiperlipidemii, ponieważ celem badań było poszukiwanie nowych właściwości tych leków, innych niż ich znany wpływ hipolipemiczny. Ponadto, hiperlipidemia jest kolejnym, obok IR, ważnym czynnikiem nasilającym stres oksydacyjny i indukującym zwiększenie stężenia ADMA. Normalizacja tego wskaźnika po kilku tygodniach stosowania leków obniżających cholesterol, powinna poprawić sprawność wątroby, a to utrudniłoby interpretację wyników.

Praca nr 1

Trocha M, Szelań A, Pieśniewska M, Fereniec-Gołębiowska L, Grotthus B, Merwid-Łąd A (2007): Effect of aging process on liver function in extracorporeal rat liver perfusion. *Hepato-Gastroenterology* 2007, 54(76), 1207-1211.

W tej pracy, wykorzystując model pozaustrojowej perfuzji wątroby szczurzej, badano czynność wątroby, u szczurów starych w porównaniu z szczurami młodymi. Podczas dwugodzinnej perfuzji pozaustrojowej, w układzie otwartym, ze stałą prędkością przepływu, pod kontrolą ciśnienia i temperatury, pobierano w określonych punktach czasowych płyn perfundujący, w którym oznaczano stężenie glukozy i aktywność enzymów wątrobowych, a pod koniec doświadczenia, badano także ilość wyprodukowanej żółci.

Zaobserwowano, zależne od wieku, różnice w przyrostach aktywności enzymów wątrobowych. Większy wzrost aktywności LDH i AST wykazano w wątrobach szczurów starych w porównaniu do szczurów młodych szczególnie między 90 a 120 min perfuzji, a w przypadku ALT, wcześniej, bo już w pierwszych 30 min perfuzji. Obserwowane zmiany w aktywności enzymów były widoczne dopiero po pewnym czasie trwania perfuzji, tzn. potrzebny był pewien czas ekspozycji wątroby na działanie czynników szkodliwych, związanych ze specyfiką modelu ELP (perfuzat, warunki *ex vivo*, i inne).

Pokazano także, zależne od wieku, różnice w stężeniu glukozy w czasie trwania perfuzji pozaustrojowej. W pomiędzy 30 a 60 min perfuzji w grupie szczurów młodych stężenie glukozy zwiększało się, a w drugiej godzinie perfuzji malało. W grupie szczurów starych, stężenie glukozy systematycznie malało przez cały jej czas trwania. Wiadomo, że wątroba z jednej strony uwalnia glukozę, m.in. z zapasów glikogenu oraz syntezuje ją procesie glukoneogenezy, ale z drugiej – zużywa ją w procesie glikolizy, aby pozyskać niezbędną energię. W grupie

szczurów młodych, w pierwszej godzinie perfuzji uwalnianie/synteza glukozy było większe niż w grupie szczurów starych. Taka różnica może wskazywać na lepiej zachowaną czynność wątroby młodej w porównaniu do starej w pierwszej godzinie perfuzji

Średnia ilość wyprodukowanej przez dwie godziny żółci w przeliczeniu na 1 gram wątroby, podczas perfuzji, była nieznacznie mniejsza u szczurów starych niż u szczurów młodych, ale różnica między średnimi wartościami nie była statystycznie znamienne. Nie było również różnicy między średnimi masami wątrób szczurów starych i młodych.

Pomimo podobnego stanu wyjściowego wątroby młodej i starej na początku perfuzji, dynamika zmian w grupie szczurów starych była inna niż w grupie szczurów młodych. Wątroby otrzymane od starych szczurów ulegały większemu uszkodzeniu i były wyraźnie mniej odporne na niesprzyjające warunki perfuzji niż wątroby młode. Wyniki tego doświadczenia zachęciły mnie do podjęcia kolejnych badań nad wpływem wieku na czynność wątroby szczurzej. Wiedząc o zaletach wielokrotnego oznaczania poszczególnych parametrów w czasie trwania czynnika uszkadzającego, postanowiłam w kolejnych badaniach zastosować model, w którym wątroba będzie podlegała niedokrwieniu i reperfuzji wewnątrz organizmu zwierzęcia (*in vivo*), podczas którego będzie można pobierać materiał do oznaczeń.

Praca nr 2

Trocha M, Merwid-Ląd A, Chlebda-Sieragowska E, Szuba A, Pieśniewska M, Fereniec-Gołębiewska L, Kwiatkowska J, Szelaąg A, Sozański T: Age-related changes in ADMA-DDAH-NO pathway in rat liver subjected to partial ischemia followed by global reperfusion. *Exp Gerontology*, praca zaakceptowana do druku DOI 10.1016/j.exger.2013.11.004.

W tym doświadczeniu badano, zależne od wieku, różnice w regulacji szlaku DDAH-ADMA-NO w warunkach niedokrwienia i reperfuzji. Wykazano między innymi, że stężenia wyjściowe ADMA na początku doświadczenia są takie same u szczurów młodych i starych. Zmiany zależne od wieku obserwowano dopiero podczas reperfuzji. W warunkach IR podczas pierwszych 15 min reperfuzji stężenie ADMA zwiększyło się w grupie szczurów młodych, a w grupie szczurów starych, przeciwnie, zmalało, ale po czterech godzinach reperfuzji, stężenia ADMA u szczurów młodych i starych były podobne. W innych badaniach wykazano, że podczas izolacji wątroby oraz w pierwszych minutach reperfuzji zwiększa się stężenie ADMA, które następnie, w miarę upływu czasu trwania perfuzji zmniejsza się. Ma to duże znaczenie praktyczne i uważa się, że jest to dobry wskaźnik rokowniczy i wskazuje na poprawę funkcji wątroby po transplantacji. Wy tłumaczeniem wzrostu stężenia ADMA w grupie szczurów młodych może być również nadmierna synteza NO zależna od większej aktywności iNOS. Wiadomo bowiem, że ADMA w pewnych warunkach pełni istotną rolę inhibitora nadmiernej syntezy NO.

Arginina jest substratem dla NO. Dla zachowania prawidłowej funkcji wątroby duże znaczenie mają nie tylko wartości stężeń argininy czy ADMA, ale również ich wzajemny stosunek. Jeśli wskaźnik A/A (arginina : ADMA) ma dużą wartość, np.: gdy stężenie ADMA jest małe, to podanie argininy nawet, gdy jej stężenie jest wyjściowo również małe, nie poprawi

czynności rozkurczowej śródbłonna. W tym badaniu pokazano, że wyjściowe wartości zarówno argininy, jak i wskaźnika A/A były znacząco większe w grupie szczurów młodych niż starych, co sugeruje, że ochrona wątroby zależna od argininy była lepsza – skuteczniejsza i sprawniejsza u szczurów młodych. Wartości zarówno samej argininy, jak i wskaźnika A/A zmniejszają się w czasie pierwszych 15 min trwania reperfuzji niezależnie od wieku szczurów. Mniejsze wartości wskaźnika A/A sugerują, że w warunkach IR wszystkie uszkodzone wątroby były pozbawione ochronnego działania argininy, niezależnie od zmian stężenia ADMA i SDMA. Warto zauważyć, że pod koniec reperfuzji, stężenia argininy i jej metylowych pochodnych, były niewielkie u wszystkich zwierząt, co wskazuje na bardzo dużą wartość monitorowania stężeń tych parametrów, w czasie trwania reperfuzji, dla kontroli sprawności wątroby.

Wzrost stężenia białka enzymatycznego iNOS obserwowany był jedynie w wątrobach pochodzących od szczurów młodych. W wątrobach starych, stężenie tego parametru w grupie poddanej IR było podobne do stężenia w grupie bez IR. Znaczenie iNOS we wczesnej fazie reperfuzji pozostaje nadal niejasne i wymaga dalszych badań. Inni badacze obserwowali w wątrobach starych, poddanych IR opóźnioną aktywację NF-kappa B w odpowiedzi na działanie TNF alfa, w porównaniu z wątrokami młodymi, co tłumaczono mniejszą aktywacją komórek Browicza-Kupffera w tej grupie wiekowej oraz zmniejszonym przepływem krwi przez wątrobę. NF-kappa B jest podstawowym czynnikiem transkrypcyjnym dla różnych prozapalnych mediatorów, m.in. dla iNOS. Prawdopodobnie z tego powodu, w wątrobach starych jest mniejsze stężenie białka enzymatycznego iNOS, mimo działania czynników szkodliwych.

Po raz pierwszy zbadano wpływ procesu starzenia na aktywność DDAH – enzymu odpowiedzialnego za metabolizm wątrobowy ADMA. Aktywność tego enzymu w wątrobach niepoddanych IR u szczurów starych i młodych była podobna. W wątrobach szczurów młodych aktywność DDAH zmniejszyła się pod wpływem IR. Nie można wykluczyć, że mniejsza aktywność DDAH wynika ze zwiększenia stężenia białka enzymatycznego iNOS oraz, prawdopodobnie, zwiększenia syntezy NO.

Wykazano zmiany wartości badanych parametrów układu NO zależne od wieku zwierząt, szczególnie zaznaczone w warunkach IR. Sugeruje to różną wrażliwość wątroby starej i młodej na uszkodzenia spowodowane niedokrwieniem, a tym samym prawdopodobnie różną wrażliwość na uszkodzenia związane z zabiegiem przeszczepienia wątroby.

Praca nr 3

Trocha M, Merwid-Ląd A, Chlebda E, Sozański T, Magdalan J, Pieśniewska M, Fereniec-Gołębiewska L, Gliniak H, Szelaż A: Influence of simvastatin on oxido-redox status and nitric oxide synthases protein concentration in rat liver subjected to "cold" ischemia. *Adv Clin Exp Med* 2010, 19(1), 43-50.

Znaczenie „niedokrwienia zimnego” w procesie przeszczepiania narządów stanowi ważny problem kliniczny i jest podejmowany w licznych pracach poglądowych i oryginalnych.

Podczas tego etapu dochodzi do wielu zmian strukturalnych i czynnościowych w różnych komórkach wątroby. Obserwuje się obrzęk tych komórek oraz spadek poziomu związków wysokoenergetycznych (ATP) i nasilenie glikolizy. Zmiany te dotyczą przede

wszystkim komórek śródbłonka. Udział komórek Browicza-Kupffera jest niewielki w porównaniu z „niedokrwieniem ciepłym” i reperfuzją. Podczas przechowywania wątroby w 4°C powstaje wewnątrzkomórkowa kwasica spowodowana przewagą metabolizmu beztlenowego w warunkach hipoksji i produkcji m.in. mleczanów, jak również uwalniania protonów podczas hydrolizy nukleotydów fosforanowych. Kwasica spełnia rolę ochronną i zapobiega utracie żywotności komórek podczas niedokrwienia. Podczas reperfuzji pH wraca do normy i jest to najprawdopodobniej przyczyną wzrostu uszkodzeń w komórkach śródbłonka („pH – paradoks”). Mechanizm tego zjawiska nie jest w pełni poznany. Sugeruje się, że pośredniczą w nim proteazy i fosfolipazy uaktywniane przy prawidłowym pH. Taka zmiana pH może powodować też otwarcie porów w błonie mitochondrium i nasilenie przepuszczalności tych organelli oraz ich obrzęk.

W tej pracy zbadano stan stresu oksydacyjnego w wątrobie szczurzej poddanej „niedokrwieniu zimnemu”. Jak można się było spodziewać, nasilenie stresu oksydacyjnego podczas tej fazy uszkodzenia wątroby było niewielkie i nie wykazano zmian stężenia nadtlenków lipidów. Zbadano także działanie simwastatyny w tych warunkach. Lek podawano za pomocą sondy dożołądkowej przez dwa tygodnie przed izolacją wątroby. Korzystne działanie tego leku widoczne było zwłaszcza w wątrobach niepoddanych niedokrwieniu – wykazano wzrost aktywności wybranych parametrów antyoksydacyjnych (SOD, CAT), oraz zwiększenie stężenia białka enzymatycznego eNOS. W wątrobach poddanych „niedokrwieniu zimnemu” w grupach leczonych simwastatyną jedynie aktywność CAT pozostała wyższa. Simwastatyna nie wpływała na stężenie białka enzymatycznego iNOS.

Wyniki tego doświadczenia zainspirowały mnie do zaprojektowania i przeprowadzenia kolejnych doświadczeń, pozwalających na poszerzenie naszej wiedzy na temat dodatkowych właściwości leków, ujawniających się w warunkach niedokrwienia i reperfuzji.

Praca nr 4

Trocha M, Merwid-Ląd A, Chlebda E, Pieśniewska M, Sozański T, Szeląg A: Effect of simvastatin treatment on rat livers subjected to ischemia/reperfusion. *Pharmacol Rep* 2010, 62 (4), 757-762.

W tym doświadczeniu badano antyoksydacyjne działanie simwastatyny w warunkach „niedokrwienia ciepłego” i reperfuzji. W tym celu opracowaliśmy trudny model częściowego niedokrwienia wątroby, z następującą po tym okresie reperfuzją całego narządu. W modelu tym, niedokrwieniu ulega 2/3 narządu (płat lewy boczny i środkowy).

Zakładając, że podczas niedokrwienia, a zwłaszcza w okresie reperfuzji, powinien rozwinąć się stres oksydacyjny, zastosowanie simwastatyny mogłoby ujawnić jej potencjalne właściwości antyoksydacyjne. ROS są produkowane przez leukocyty i komórki śródbłonka, a przede wszystkim przez aktywne komórki Browicza-Kupffera. Wolne rodniki powstają w wyniku aktywacji enzymów cytoplazmatycznych i autooksydacji endogennych substratów. Również peroksydacja lipidów, głównie poprzez oksydowane lipoproteiny o niskiej gęstości (oxLDL), zwiększa ilość wolnych rodników. Nadtlenki wchodzą m.in. w interakcje z żelazem i poprzez produkcję aktywnych rodników hydroksylowych prowadzą do śmierci komórki.

Związki tlenu reagując z rodnikiem NO* produkowanym przez komórki Browicza-Kupffera przekształcają się w jeszcze bardziej toksyczny i reaktywny rodnik – peroksynitryt. Reperfuzja utlenowaną krwią, niezbędna do zachowania żywotności niedokrwionych organów, może więc nasilać ich uszkodzenia przez produkcję wolnych rodników tlenowych („reflow paradox”). Podczas reoksygenacji niedokrwionych tkanek dochodzi do odbudowy substratów dla metabolizmu tlenowego m.in. hipoksantyny, która z kolei odpowiada za syntezę wysokoenergetycznych rodników. Zwiększona aktywność syntetazy prostaglandyn i lipooksygenazy w obecności NADH lub NADPH prowadzi do wzrostu produkcji nadtlenu (O₂).

W tej pracy zaobserwowano kompensacyjny wzrost aktywności CAT i GPx po 1 godzinie reperfuzji oraz niewielki spadek aktywności SOD, jako mniej czułego od tych dwóch enzymów, wskaźnika bariery antyoksydacyjnej. Nie wykazano w tym doświadczeniu działania ochronnego simwastatyny. Nie zaobserwowano wzrostu GPx oraz CAT w grupach leczonych simwastatyną, co sugeruje, że w warunkach IR nie ma ona działania antyoksydacyjnego, ale przeciwnie, wykazano niewielki szkodliwy wpływ tego leku, nasilający stres oksydacyjny. Taki wynik jest spójny z wpływem simwastatyny na aktywność aminotransferaz. Pomimo, że wyjściowo po 3 tygodniach stosowania leku nie zaobserwowano wzrostu aktywności tych enzymów, to jednak po okresie IR ich aktywność znacząco wzrosła, co sugeruje większe uszkodzenie hepatocytów w tej grupie. Te wyniki potwierdzają sugerowane wcześniej właściwości prooksydacyjne niektórych statyn, które hamują nie tylko syntezę cholesterolu, ale także nie-sterolowych związków, takich jak ubikwion (koenzym Q10), którego synteza przebiega tą samą ścieżką, a który jest niezbędnym kofaktorem w mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej i tworzeniu ATP. W formie zredukowanej, koenzym Q10 jest uważany za lipofilny przeciwutleniacz, który chroni błonę komórkową i krążące lipoproteiny przed utlenianiem.

W kolejnym doświadczeniu zbadano działanie simwastatyny na poszczególne parametry układu tlenu azotu (NO) w wątrobach poddanych IR.

Praca nr 5

Trocha M, Merwid-Ląd A, Szuba A, Chlebda E, Pieśniewska M, Sozański T, Szeląg A: Effect of simvastatin on nitric oxide synthases (eNOS, iNOS) and arginine and its derivatives (ADMA, SDMA) in ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Pharmacol Rep* 2010, 62(2), 343-351.

Wyniki dotychczasowych badań nad antyoksydacyjnymi właściwościami simwastatyny są niejednoznaczne. Sugerują niewielki ochronny wpływ tego leku na wątrobę poddaną „niedokrwieniu zimnemu” (praca nr 3), ale w „niedokrwieniu ciepłym” (praca nr 4) lek ten wykazuje raczej działanie prooksydacyjne. W kolejnym doświadczeniu poszukiwano nowych właściwości tego leku – badano jego wpływ na szlak ADMA-DDAH-NO.

W badaniu tym pokazano, że w warunkach IR dochodzi do ważnych zmian w syntezie i przemianie NO, o czym świadczy zmniejszenie stężenia argininy oraz wskaźnika A/A, jak również zwiększenie stężenia białka enzymatycznego eNOS i iNOS i wzrost stężenia ADMA

– inhibitora syntetaz NO. W tych warunkach wykazano ochronne działanie simwastatyny, które było wyraźnie widoczne już w okresie „niedokrwienia ciepłego”, w czasie którego wzrosło stężenie argininy i wskaźnika A/A tylko w grupie szczurów leczonych wcześniej simwastatyną. Podczas reperfuzji stężenie argininy zmniejszyło się, a stężenie ADMA wzrosło, powodując zmniejszenie wartości wskaźnika A/A. W grupie leczonej simwastatyną wykazano zwiększenie stężenia argininy, a tym samym wzrost wartości wskaźnika A/A. Nie wykazano wpływu simwastatyny na stężenie ADMA, które wzrosło w okresie reperfuzji zarówno w grupie otrzymującej, jak i nie otrzymującej tego leku. Zaletą tak zaprojektowanego doświadczenia była możliwość śledzenia dynamiki zmian stężeń argininy i jej pochodnych podczas trwania niedokrwienia i reperfuzji. Pojedynczy pomiar pod koniec okresu reperfuzji nie wykazałby np. wpływu simwastatyny na stężenie argininy w pierwszych 30 min reperfuzji.

Zmiany stężeń białek enzymatycznych syntaz NO świadczą o ochronnym działaniu simwastatyny. W grupie niepoddanej IR zaobserwowano wzrost stężenia białka enzymatycznego eNOS, a w grupie poddanej IR spadek stężenia białka enzymatycznego iNOS. Działanie NO produkowanego przy udziale eNOS ma znaczenie ochronne. NO w warunkach fizjologicznych jest stale produkowany w niewielkich ilościach i gromadzony w tkankach, a podczas niedokrwienia jest uwalniany. Stąd większy wzrost białek enzymatycznych eNOS w wątrobach niepoddanych IR może wskazywać na ochronne działanie stosowanego leku. Nadmierna produkcja NO przez iNOS w trakcie reperfuzji może mieć z kolei działanie szkodliwe. W okresie reperfuzji przy dostępie tlenu powstaje znaczna ilość ROS, które w reakcji z NO przekształcają się w cytotoksyczny peroksynitryt. Ponadto, nasiloną aktywność iNOS ma znaczenie w rozwoju procesów zapalnych w uszkodzonej wątrobie. Stąd mniejszy wzrost białek enzymatycznych iNOS może wskazywać na mniejszy stopień uszkodzenia wątroby poddanej IR.

Praca nr 6

Trocha M, Merwid-Ląd A, Chlebda E, Sozański T, Pieśniewska M, Gliniak H, Szelań A: Influence of ezetimibe on selected parameters of oxidative stress in rat liver subjected to ischemia/reperfusion. Praca zaakceptowana do druku w AMS. DOI: 10.5114/aoms.2013.38087.

W kolejnej pracy postanowiono zbadać właściwości antyoksydacyjne nowego leku hipolipemicznego – ezetymibu. Charakteryzuje się on dobrą tolerancją i niewielką liczbą działań niepożądanych. Aktualnie jest stosowany najczęściej u pacjentów, u których monoterapia statynami jest niewystarczająca, jak również – z różnych przyczyn – konieczne jest zmniejszenie dawki lub zaprzestanie podawania statyn.

W tym doświadczeniu zmodyfikowano metodykę wydłużając zarówno czas niedokrwienia (do 1 godziny), jak i reperfuzji (do 4 godzin), w porównaniu do badań z simwastatyną. Celem tej modyfikacji było wydłużenie czasu oddziaływania określonych warunków na badane parametry. Zmienione warunki miały ułatwić wykazanie ewentualnych zmian w wątrobie w warunkach IR.

W tym badaniu wykazano ochronne działanie ezetymibu na wątrobę poddaną IR. To ochronne, antyoksydacyjne działanie tego leku polegało na zwiększeniu stężenia GSH i w mniejszym stopniu na zmianach aktywności GPx. W grupach poddanych IR stężenie GSH w grupie z ezetymibem było większe niż w grupie bez ezetymibu, a spadek aktywności GPx spowodowany IR występował tylko u zwierząt, którym nie podawano ezetymibu. U zwierząt leczonych ezetymibem nie było różnic w aktywności GPx między grupami poddanymi i niepoddanymi IR. Podobnie, jak w poprzednich doświadczeniach, np. z simwastatyną, nie wykazano żadnych różnic w aktywności SOD. Obserwowano jedynie nieistotną statystycznie tendencję do zmniejszenia aktywności tego enzymu w warunkach IR.

Zgodnie z oczekiwaniami, po kilku tygodniach podawania ezetymibu, nie obserwowano zwiększenia aktywności aminotransferaz. Co ciekawe, w przypadku ezetymibu obserwowano jednak inną tendencję niż w doświadczeniu z simwastatyną (praca nr 4). Chodzi o to, że wzrost wartości transaminaz w czasie reperfuzji był mniejszy w grupie otrzymującej ezetymib w porównaniu z grupą bez ezetymibu. Różnice między średnimi wartościami nie były istotne statystycznie, ale tendencja – mniejszy wzrost aktywności transaminaz, może świadczyć o mniejszym lub wolniejszym narastaniu uszkodzenia, a więc może sugerować pewne ochronne działanie tego leku w warunkach IR. Jednakże należy wyraźnie podkreślić, że w tym badaniu, nie wykazano ochronnego działania ezetymibu w warunkach IR, przy danym układzie doświadczenia i liczebności badanych grup.

Praca nr 7

Trocha M, Merwid-Ląd A, Sozański T, Chlebda-Sieragowska E, Szuba A, Dziegiel P, Pieśniewska M, Fereniec-Gołębiowska L, Kwiatkowska J, Gomułkiewicz A, Cwynar-Zajac Ł, Brykner R, Szela A: Influence of ezetimibe on ADMA-DDAH-NO pathway in rat liver subjected to partial ischemia followed by global reperfusion. *Pharmacol Rep* 2013, 65 (1), 122-133.

W poprzednich badaniach wykazano, że ezetymib ma korzystne działanie antyoksydacyjne, w tym doświadczeniu postanowiono zbadać wpływ tego leku na niektóre parametry szlaku ADMA-DDAH-NO. Ezetymib, przeciwnie do simwastatyny (praca nr 5), wpływał na stężenie ADMA, ale tylko w wątrobach poddanych IR. W grupie otrzymującej ten lek stężenie ADMA było małe, porównywalne do wartości oznaczonych w grupie niepoddanej IR. W grupach poddanych IR i nieotrzymujących ezetymibu stężenie ADMA było największe. Różnice te były statystycznie istotne w 30 min reperfuzji. W grupie otrzymującej ezetymib niepoddanej IR, stężenia ADMA było najmniejsze, ale jednocześnie w tej grupie wykazano największą aktywność DDAH – enzymu metabolizującego ADMA w wątrobie, co może wyjaśniać przyczynę małych stężeń ADMA.

W tym doświadczeniu wykazano interesującą zależność: w grupie otrzymującej ezetymib niezależnie od warunków IR stężenie białka enzymatycznego eNOS było największe a stężenie ADMA związku, który hamuje tę syntazę było najmniejsze. Dodatkowo, w grupach niepoddanych IR w pierwszych 90 min. doświadczenia wykazano duże stężenie argininy, która jest substratem dla tego eNOS.

Pod koniec reperfuzji stężenia ADMA we wszystkich badanych grupach były małe, podobnie jak w poprzednich badaniach. Dlatego zbadano także dynamikę zmian w stężeniu ADMA poprzez wielokrotne pomiary w czasie trwania reperfuzji, a nie tylko jednorazowo pod koniec doświadczenia. Większe stężenie ADMA właśnie na początku reperfuzji może odpowiadać za hamowanie syntezy NO, a tym samym za zaburzenia równowagi pomiędzy NO i endoteliną, a w konsekwencji, za skurcz naczyń, niedokrwienie i dalsze upośledzenie funkcji wątroby.

Na stężenie NO wpływa również ilość obecnej argininy oraz wartość wskaźnika A/A, a więc stosunek stężenia argininy do stężenia ADMA. Wartości obu tych parametrów były większe w grupach niepoddanych IR, przy czym największe wartości wykazano w grupie otrzymującej ezetymib. W grupach poddanych IR nie wykazano różnic zależnych od obecności leku. Uważamy, że ezetymib zwiększał stężenie argininy i w ten sposób chronił wątrobę przed niedoborem substratu dla syntezy NO, ale jedynie w warunkach fizjologicznych. Takiego działania nie obserwowaliśmy w warunkach IR. Wyników tego badania nie można bezpośrednio odnieść do wyników otrzymanych w badaniu z simwastatyną, ponieważ oba doświadczenia różniły się zarówno czasem niedokrwienia i reperfuzji, jak również punktami czasowymi, w których pobierano krew do oznaczeń. W przypadku doświadczenia z simwastatyną pierwsze oznaczenie było wykonane tuż po okresie niedokrwienia i w tym punkcie czasowym, w grupie z simwastatyną wykazano zwiększenie stężenia argininy, które następnie zmniejszyło się w czasie pierwszych 30 min reperfuzji. W tak zaplanowanym doświadczeniu nie można odpowiedzieć na pytanie: jaki wpływ na produkcję argininy miał ezetymib tuż po niedokrwieniu, ponieważ pierwszego pomiaru dokonano dopiero w 30 minucie reperfuzji, a w tym czasie, podobnie jak w badaniu z simwastatyną, stężenie argininy było małe.

W badaniach ekspresji mRNA dla enzymów odpowiedzialnych za syntezę i rozpad ADMA wykazano największą ekspresję mRNA dla PRMT1 w grupie niepoddanej IR i bez leku. Aktywność PRMT1 odpowiedzialnej za syntezę ADMA, podobnie jak ekspresja mRNA dla PRMT1, zazwyczaj zwiększa się w warunkach stresu oksydacyjnego, dlatego otrzymane wyniki są trudne do interpretacji. Na wynik doświadczenia mogły mieć wpływ różne czynniki, w tym także te, które w badaniach innych autorów wykorzystywane są do wywołania stresu oksydacyjnego. W naszych badaniach po raz pierwszy analizowano wpływ ezetymibu na ekspresję mRNA dla PRMT1 w wątrobie poddanej IR. Wykazano mniejszą ekspresję mRNA dla tego enzymu w wątrobach z grupy otrzymującej ezetymib, niepoddanej IR w porównaniu z grupą nieotrzymującą ten lek. Informacje na ten temat w bazach danych są skąpe i właściwie nie mamy możliwości skonfrontowania uzyskanych wyników z doświadczeniami innych badaczy.

Ekspresja mRNA dla DDAH1, enzymu metabolizującego ADMA do cytruliny i dimetyloaminy w komórkach śródbłonna i hepatocytach, była największa w grupach poddanych IR. Ponieważ aktywność DDAH zwiększyła się w grupie z ezetymibem poddanej IR, zmiana ekspresji mRNA dla tego enzymu jest niezależna od działania tego leku i prawdopodobnie jest reakcją obronną na działanie szkodliwych warunków IR.

Podsumowując:

W badaniach oceny funkcji wątroby przeprowadzonych w powyższym cyklu prac, wykorzystano modele doświadczalne perfuzji pozaustrojowej, „niedokrwienia zimnego” oraz niedokrwienia i reperfuzji *in vivo*. Badano wpływ procesu starzenia oraz działanie leków hipolipemizujących (simwastatyny i ezetymibu) na czynność wątroby szczurzej w tych warunkach

W dwóch pracach badano wpływ wieku na czynność wątroby szczurzej oraz parametry układu NO. Do tego celu wykorzystano model perfuzji pozaustrojowej (praca nr 1) oraz model częściowego niedokrwienia i reperfuzji *in vivo* (praca nr 2).

Otrzymano następujące wyniki:

- 1) Aktywność enzymów wątrobowych i stężenia glukozy u szczurów nie były zależne od wieku zwierząt. Jednak w czasie perfuzji pozaustrojowej wątroby szczurów młodych i starych dynamika zmian tych parametrów była inna. W wątrobach pochodzących od szczurów starych, wykazano większą aktywność enzymów wątrobowych i mniejsze stężenie glukozy, jak również nieco mniejszą ilość produkowanej żółci; sugeruje to, że wątroby starych szczurów były bardziej wrażliwe i ulegały większemu uszkodzeniu w czasie pozaustrojowej perfuzji niż wątroby młode (praca nr 1).
- 2) Stężenia ADMA przed niedokrwieniem, jak również stężenie białka enzymatycznego iNOS i aktywność DDAH u szczurów niepoddanych IR były podobne u szczurów starych i młodych. Przeciwnie, wyjściowe stężenia argininy i wartości wskaźnika A/A były znacznie większe u szczurów młodych niż starych; sugeruje to, że ochrona wątroby zależna od argininy była skuteczniejsza u szczurów młodych (praca nr 2).
- 3) W warunkach IR, w pierwszych 15 minutach reperfuzji, stężenie ADMA zwiększyło się u szczurów młodych, co być może było reakcją na zwiększoną produkcję NO, związaną ze zwiększoną aktywnością iNOS. Mniejsze wartości wskaźnika A/A sugerują, że w warunkach IR wszystkie uszkodzone wątroby były pozbawione ochronnego działania argininy, niezależnie od zmian stężenia ADMA. Pod koniec reperfuzji, ilości argininy i jej metylowych pochodnych, były niewielkie we wszystkich grupach, co sugeruje bardzo duże znaczenie monitorowania stężeń tych parametrów w czasie reperfuzji dla oceny stanu układu NO w wątrobie (praca nr 2).
- 4) W wątrobach szczurów młodych IR zmniejszało aktywność DDAH. Można przypuszczać, że zahamowany rozpad ADMA był reakcją na zwiększone wytwarzanie NO spowodowane zwiększeniem aktywności iNOS (praca nr 2).

W kolejnych pracach badano właściwości antyoksydacyjne oraz wpływ na przemianę NO dwóch leków hipolipemizujących: ezetymibu i simwastatyny w wątrobach szczurzych.

Celem tych badań było poszukiwanie nowych, nieznanych dotychczas właściwości badanych leków, innych niż ich działanie hipolipemizujące.

W tym celu wykorzystano model częściowego „niedokrwienia ciepłego” i reperfuzji (prace nr 4, 5, 6, 7) wątroby u szczurów oraz, w jednym doświadczeniu (praca nr 3), model

„niedokrwienia zimnego”. W doświadczeniach wykorzystano zwierzęta zdrowe, bez zaburzeń lipidowych.

Analizując otrzymane wyniki można wysnuć następujące wnioski:

Oba badane leki, podawane szczurom przez kilka tygodni, wykazały działanie ochronne na wątrobę, poddaną zabiegowi niedokrwienia i reperfuzji. Właściwości antyoksydacyjne tych leków nie były tak wyraźne, jak ich wpływ na przemianę NO. Analizując badane parametry układu oksydo-redukcyjnego można zauważyć podobieństwa i różnice w działaniu obu leków:

- 1) W wątrobach niepoddanych niedokrwieniu i reperfuzji simwastatyna działała antyoksydacyjnie, na co wskazuje zwiększenie aktywności SOD i CAT (praca nr 3).
- 2) W wątrobach poddanych „niedokrwieniu zimnemu” lek ten zwiększał aktywność CAT, co również mogłoby wskazywać na jego działanie antyoksydacyjne. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że nasilenie stresu oksydacyjnego było niewielkie w tym doświadczeniu – brak zwiększenia stężenia nadtlenków lipidów – należy uznać, że to działanie ujawniające się w wyniku „niedokrwienia zimnego” jest wątpliwe i wymaga dalszych badań (praca nr 3).
- 3) W warunkach „niedokrwienia ciepłego” i reperfuzji nie wykazano działania antyoksydacyjnego simwastatyny. W tym modelu doświadczalnym zmniejszenie aktywności GPx w grupie otrzymującej simwastatynę, a tym samym istotna różnica między grupą otrzymującą i nieotrzymującą tę statynę sugerują wręcz przeciwne działanie tzn. pewne właściwości prooksydacyjne tego leku (praca nr 4)
- 4) W odróżnieniu do simwastatyny, ezetymib wykazywał działanie antyoksydacyjne ujawniające się w wątrobach poddanych IR. Wskazuje na to zwiększenie stężenia GSH oraz mniejszy spadek aktywności GPx w grupach otrzymujących ezetymib niż w grupach bez tego leku. Sugeruje to ochronne działanie ezetymibu na wątrobę w warunkach stresu oksydacyjnego w przebiegu IR (praca nr 6).

Wykazano wpływ obu leków na poszczególne elementy szlaku ADMA-DDAH-NO. Oba badane leki – ezetymib i simwastatyna – podawane przewlekle przed wywołaniem stresu, wykazują działanie ochronne poprzez wpływ na przemianę NO, i to zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i warunkach IR.

- 1) Działanie ochronne simwastatyny wykazano w wątrobach poddanych IR i wyrażało się wzrostem stężenia argininy tuż po okresie niedokrwienia, przy jednoczesnym braku zmian w stężeniu ADMA, a to oznaczało zwiększenie również wartości wskaźnika A/A. Lek ten zwiększał również stężenie białka enzymatycznego eNOS w wątrobach niepoddanych IR oraz spowodował słabszy niż w wątrobach z grupy nieotrzymującej leku wzrost stężenia białka enzymatycznego iNOS po okresie reperfuzji (praca nr 5)
- 2) Działanie ezetymibu ujawniło się zarówno w wątrobach zdrowych, jak i tych poddanych IR. Ezetymib w wątrobach bez IR powodował zwiększenie stężenia argininy i wskaźnika A/A i największą obserwowaną aktywność DDH. W grupach otrzymujących ezetymib wykazano też większe stężenie białka enzymatycznego eNOS w porównaniu do grupy bez tego leku, ale poddanych IR. Ezetymib zmniejszał także stężenie ADMA w grupie poddanej IR do małych wartości zbliżonych do tych, które wykazano w grupach niepoddanych IR. Ezetymib zmniejszał również ekspresję mRNA

dla PRMT1. Ekspresja mRNA dla DDAH1 zwiększyła się w grupach poddanych IR niezależnie od działania leku. A ponieważ aktywność DDAH wzrosła jedynie w grupie otrzymującej ezetymib, można się spodziewać, że aktywność tego enzymu zależy od innych jeszcze czynników, które są zahamowane w wyniku działania IR (praca nr 7).

W wyżej opisanych doświadczeniach oceniono także wpływ obu leków na aktywność aminotransferaz. Wyniki badań sugerują tendencje do większego upośledzenia czynności wątroby w czasie reperfuzji w wyniku stosowania przewlekłego simwastatyny przed zabiegiem IR:

- 1) Ani simwastatyna ani ezetymib, w podawane przez kilka tygodni dożołądkowo, nie wykazywały działania hepatotoksycznego, mierzonego aktywnością aminotransferaz. Aktywności tych enzymów przed procedurą niedokrwienia i reperfuzji, w grupach z lekami lub bez nich były podobne (prace nr 4, 6).
- 2) W grupie otrzymującej simwastatynę, obserwowano jednak tendencję do większego narastania stężenia aminotransferaz w czasie reperfuzji, co może sugerować niekorzystny wpływ tego leku na czynność wątroby szczurzej poddanej IR (praca nr 4)
- 3) Przeciwnie niż w grupie z simwastatyną, zwiększenie aktywności aminotransferaz w grupie otrzymującej ezetymib, poddanej IR był mniejszy niż w grupie bez tego leku. To sugeruje ochronne działanie tego leku na czynność wątroby w warunkach IR (praca nr 6).

D. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH (ARTYSTYCZNYCH).

Moja aktywność naukowa koncentrowała się wokół następujących tematów:

1. Badania nad zastosowaniem antagonistów receptorów H₃-histaminowych w hamowaniu łaknienia oraz regulacji spożycia etanolu (temat zamknięty)

Istotnym problemem w społeczeństwie borykającym się z epidemią otyłości jest regulacja łaknienia. Do tej pory nie dysponujemy skutecznym i bezpiecznym lekiem, który hamowałby łaknienie nie wywołując jednocześnie niebezpiecznych działań niepożądanych. Wiemy, że histamina, działając m.in. na podwzgórze, wpływa na różne funkcje organizmu, np. pobór pokarmu i płynów, wydzielanie neurohormonów, regulację cyklu snu i czuwania. W wcześniejszych pracach pokazano, że hamowanie receptorów H₃- oraz pobudzenie receptorów H₁-histaminowych może powodować zhamowanie łaknienia. Z tego powodu postanowiliśmy zbadać wpływ betahistyny (agonista receptorów H₁- i antagonistę receptorów H₃-histaminowych) na pobór pokarmu u szczurów. Z naszych doświadczeń wynika, że lek ten hamuje łaknienie po podaniu dootrzewnowym, nie ma natomiast wpływu na przyjmowanie pokarmu po podaniu doustnym.

Kolejnym istotnym zagadnieniem jest kontrola spożycia etanolu przez szczury. W poprzednich badaniach wykazano, że betahistyna podana dootrzewnowo nasila pobór wody a hamuje przyjmowanie etanolu u szczurów uzależnionych od tego związku. W naszym doświadczeniu lek ten podawany dożołądkowo nie wykazywał takich właściwości.

Wyniki prac nad tym tematem zostały opublikowane w trzech pracach oryginalnych (w dwóch z nich byłam drugim, a w jednym – trzecim autorem) oraz przedstawione w dwóch doniesieniach zjazdowych na VII Międzynarodowej Konferencji Europejskiego Towarzystwa Farmakologii Klinicznej i Farmakoterapii we Florencji

2. Wykorzystanie perfuzji pozaustrojowej wątroby szczurzej do oceny wpływu różnych związków na jej czynność i strukturę oraz parametry układu oksydacyjnego i przemiany tlenu azotu

Przed zabiegiem przeszczepienia wątroba jest izolowana z organizmu dawcy i przechowywana. Ulega wtedy uszkodzeniu. W cyklu doświadczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem perfuzji pozaustrojowej badaliśmy wpływ leków blokujących kanały wapniowe jej czynność i strukturę. Perfuzja wątroby w pierwszym doświadczeniu przeprowadzana była w układzie zamkniętym. Do perfuzatu dodaliśmy jeden z leków blokujących kanały wapniowe: nifedypinę, nitrendypinę lub werapamil w małych stężeniach, w których leki te nie wpływają na aktywność enzymów mikrosomalnych wątroby. W trakcie perfuzji oznaczono metabolity antypiryny jako wskaźnika funkcji metabolicznej wątroby. Wykazaliśmy, że każdy z badanych inhibitorów kanału wapniowego, podany w niskim stężeniu, wykazywał ochronne działanie na czynność wątroby w czasie perfuzji pozaustrojowej. Wyniki tego doświadczenia zachęciły mnie do przeprowadzenia kolejnych badań, które stały się podstawą do napisania rozprawy doktorskiej.

W kolejnych badaniach proces perfuzji został zmodyfikowany i unowocześniony. Perfuzję przeprowadzaliśmy w obiegu otwartym ze stałą prędkością przepływu, pod kontrolą ciśnienia, utlenowania perfuzatu i temperatury. Okazało się, że wśród leków blokujących kanały wapniowe najsilniejsze działanie na wątrobę poddaną „niedokrwieniu zimnemu” podczas przechowywania w temp. 4°C przez 24 godziny, wykazuje nitrendypina, zwłaszcza, gdy jest dodana nie tylko do płynu służącego do przetrzymywania narządów przed przeszczepieniem (HTK), ale również do płynu Ringera służącego do przepłukania tego narządu przed rozpoczęciem perfuzji.

Wykorzystując tę procedurę badano także wpływ rozpuszczalnej w wodzie soli sodowej kwercyliny (NaQSA) na aktywność SOD oraz przemianę NO. Wykazano, że związek ten dodany do perfuzatu wykazuje pewne działanie ochronne na układ NO jedynie w małych stężeniach, powodując wyraźne zwiększenie aktywności DDAH oraz mniejszy wzrost ADMA. Nie wykazano wpływu NaQSA na aktywność SOD w wątrobie w tych warunkach. Wyniki tej pracy stały się elementem cyklu doświadczeń nad poznaniem właściwości NaQSA, przeprowadzonymi przez nasz zespół w Zakładzie Farmakologii. Należy zaznaczyć, że NaQSA jest oryginalnym związkiem, który powstał w Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Politechniki Rzeszowskiej.

Wyniki doświadczeń nad związkami modulującymi czynność wątroby w perfuzji pozaustrojowej zostały opublikowane w trzech pracach oryginalnych (w dwóch byłam pierwszym autorem), trzech pracach poglądowych (we wszystkich byłam pierwszym autorem) oraz w mojej rozprawie doktorskiej. Zostały przedstawione także w trzech doniesieniach zjazdowych.

3. Wpływ flawonoidów na indukowaną lekami immunosupresyjnymi (cyklofosfamidem) toksyczność narządową, stres oksydacyjny i parametry układu immunologicznego

Cyklofosfamid jest uznanym lekiem przeciwnowotworowym charakteryzującym się dodatkowo silnymi właściwościami immunosupresyjnymi. Jego zastosowanie ograniczają liczne działania niepożądane, dotyczące zwłaszcza układu moczowego (krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego) oraz hematopoezy (zwłaszcza spadek liczby leukocytów i płytek krwi).

W doświadczeniach związanych z tym tematem próbujemy odpowiedzieć na pytanie: czy flawonoidy, których korzystne właściwości na organizm są szeroko badane, chronią narządy przed toksycznym działaniem cyklofosfamidu. W tym celu badaliśmy różne parametry funkcji poszczególnych narządów (wątroba, nerki, jelita, pęcherz moczowy) na wskaźniki stresu oksydacyjnego oraz przemiany NO. Struktura narządów oceniana była w badaniu histopatologicznym. Moryna, naturalnie występujący flawonoid, jedynie częściowo odwracała zmiany wywołane przez cyklofosfamid (hipoproteinemię, spadek liczby erytrocytów). Korzystne działanie antyoksydacyjne wykazywała natomiast sól sodowa moryny (NaMSA). Odwracała wywołany przez cyklofosfamid spadek aktywności SOD oraz spadek stężenia GSH w nerkach. W kolejnej pracy oceniliśmy wpływ soli sodowej moryny (NaMSA) na składowe przemiany NO. Zaskakujące wyniki tego doświadczenia wskazują na pewne korzystne działanie cyklofosfamidu (spadek ADMA i wzrost aktywności DDAH) bez istotnego ochronnego działania badanego flawonoidu.

Do tej pory, wyniki pracy nad tym zagadnieniem zostały opublikowane w trzech pracach oryginalnych, w których jestem drugim autorem oraz w dziewięciu doniesieniach zjazdowych prezentowanych na różnych zjazdach międzynarodowych i krajowych.

4. Porównanie wpływu naturalnych flawonoidów moryny i kwercetyny oraz ich rozpuszczalnych w wodzie soli (soli sodowej kwasu kwercytyno-5-sulfonowego i soli sodowej kwasu moryno-5-sulfonowego) na wybrane parametry układu oksydoredukcyjnego u myszy zatrutych kadmem

Kadm jest szeroko rozpowszechnionym w środowisku związkami. Jednym z mechanizmów uszkodzenia narządów w zatruciu tym metalem jest jego działanie prooksydacyjne. Obniża on aktywność SOD, CAT, GPx, oraz stężenie GSH wiążąc się z grupami tiolowymi. Dotychczas nie znaleziono nietoksycznych substancji, które obniżałyby stężenie kadmu w organizmie i hamowały jego toksyczność. Wykazano, że flawonoidy takie, jak kwercytyna i moryna, tworzą kompleks z kadmem będącym na drugim stopniu utlenienia i wykazują silne właściwości antyoksydacyjne. Rozpuszczalne w wodzie sole sodowe kwercytyny i moryny (NaQSA, NaMSA) są nietoksyczne i, podobnie jak ich naturalne odpowiedniki, wykazują ochronne działanie na narządy w zatruciu kadmem.

W badaniach prowadzonych w naszym zakładzie wykazaliśmy ich korzystne działanie na peroksydację lipidów w modelu myszy zatrutych kadmem. Wykazaliśmy, że w grupach otrzymujących kadm razem z jednym z flawonoidów, aktywność SOD oraz stężenie GSH wzrosło istotnie statystycznie w porównaniu do grupy otrzymującej sam kadm. Jednak wartości

tych parametrów były nadal mniejsze niż w grupie niezatrutej tym metalem. Nie wykazano potęgowania działania dwóch równocześnie zastosowanych zawiązków: soli sodowych moryny i kwercyiny.

Wyniki pracy nad tym zagadnieniem zostały opublikowane w dwóch pracach oryginalnych oraz prezentowane w jednym doniesieniu zjazdowym.

5. Wpływ antybiotyków makrolidowych – erytromycyny i roksytromycyny oraz drogi ich podawania na rozwój przeszczepionego myszom czerniaka linii B16F10

Makrolidy to grupa antybiotyków posiadająca wiele dodatkowych właściwości, m.in. działanie prokinetyczne, immunomodulujące i przeciwzapalne. Prawdopodobnie posiadają one również działanie przeciwnowotworowe.

Celem doświadczenia była ocena wpływu erytromycyny i roksytromycyny, podawanych dootrzewnowo, na wzrost guza u myszy B16F10 z przeszczepionym czerniakiem. Erytromycyna hamowała wzrost guza, gdy podawana była w stężeniu 10 i 50 mg/kg, roksytromycyna – jedynie w stężeniu 10 mg/kg. Obiecujące wyniki tego doświadczenia skłoniły nas do kontynuacji tego tematu i zbadania działania przeciwnowotworowego tych leków po podaniu dożołądkowym. Niestety, nie udało się wykazać takiego działania makrolidów po zmianie drogi podania – nie hamowały one wzrostu guza ocenianego pod koniec eksperymentu, chociaż średnia objętość guzów była mniejsza niż w grupie kontrolnej.

Wyniki badań prowadzonych nad tym tematem zostały opublikowane w jednej pracy oryginalnej oraz zaprezentowane w jednym doniesieniu zjazdowym.

6. Wpływ omeprazolu i ranitydyny na biodostępność winpocetyny po podaniu doustnym u szczurów

Winpocetyna jest pochodną winkaminy stosowaną w wielu chorobach naczyniowych i degeneracyjnych mózgu. Jest związkiem słabo rozpuszczalnym w wodzie, podlegającym efektowi pierwszego przejścia przez wątrobę. Biodostępność tego leku po podaniu doustnym jest mała i wynosi zaledwie 7%. Obecność pokarmu zwiększa biodostępność winpocetyny. Wiemy, że pokarm jest czynnikiem, który istotnie zmienia farmakokinetykę wielu leków. Zmiana pH w przewodzie pokarmowym, poprzez zmianę jonizacji cząsteczek, może modulować wchłanianie leków. Do tej pory nie został zbadany wpływ inhibitorów pompy protonowej na biodostępność podanej doustnie winpocetyny.

W naszym doświadczeniu szczury otrzymywały pojedynczą dawkę winpocetyny razem lub bez dootrzewnowo podanego, 5 dni wcześniej, omeprazolu. Stężenie winpocetyny było badane w określonych przedziałach czasowych. Wykazano, że omeprazol nie wpływa na biodostępność winpocetyny.

Efektem pracy na tym temacie jest praca oryginalna i doniesienie zjazdowe.

7. Wpływ preparatu odmiany uprawnej derenia właściwego (*Cornus mas L.*) na stężenie lipidów w surowicy zwierząt

We współpracy z Katedrą Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz z Arboretum i Zakładem Fizjografii w Bolestraszcach badamy potencjalne możliwości zastosowania owoców derenia właściwego (*Cornus mas L.*) w profilaktyce i leczeniu. Zaplanowaliśmy szereg doświadczeń, z których część jest wciąż wykonywana. Owoce derenia właściwego są niezwykle cennym surowcem o unikalnym składzie. Bardzo popularne w Polsce w latach przedwojennych, wykorzystywane w celach spożywczych i medycynie naturalnej, po wojnie zostały zapomniane. Jednocześnie, w ostatnich latach pojawiają się coraz liczniejsze doniesienia naukowe o pozytywnych właściwościach farmakologicznych różnych gatunków derenia.

Pierwszym etapem prac była ocena składu liofilizatu z owoców derenia właściwego. Na podstawie analizy HPLC-MS/MS wykazano obecność czynnych biologicznie substancji z grupy irydoidów (kwas loganowy i kornuzyd) oraz antocyjanów, co dało podstawę do planowania kolejnych badań.

W pierwszym badaniu *in vivo* ocenialiśmy wpływ suplementacji liofilizatu z owoców derenia właściwego na aktywność seksualną królików ocenianą w testach behawioralnych oraz jakość biologiczną nasienia i stężenie hormonów płciowych u tych zwierząt. Jakość nasienia badaliśmy oceniając koncentrację plemników w jednostce objętości i morfologię plemników w ocenie mikroskopowej oraz właściwości ruchowe plemników z wykorzystaniem, komputerowo wspomaganą, analizy jakości nasienia. Wykazaliśmy wpływ doustnie podawanego liofilizatu z owoców derenia na wzrost aktywności seksualnej, wyrażony istotnym wzrostem liczby pokrytych samic i zwiększeniem ilości ejakulacji. Obserwowaliśmy także nieistotne statystycznie skrócenie czasu od dopuszczenia samicy do pierwszego pokrycia i ejakulacji oraz czasu od ejakulacji do kolejnego pokrycia.

W kolejnym doświadczeniu badaliśmy działanie liofilizatu z owoców derenia właściwego u królików z, indukowaną dietą, hiperlipidemią i miażdżycą. Ocenialiśmy poziom lipidów oraz wpływ liofilizatu na układ oksydoredukcyjny w wątrobie, stężenie cytokin prozapalnych, fibrynogenu, nasilenie zmian miażdżycowych w aorcie oraz ekspresję białek wewnątrzjądrowych PPAR alfa w wątrobie. Wykazaliśmy, że badany preparat spowodował zmniejszenie stężenia trójglicerydów w surowicy, zmniejszenie wartości wskaźnika aterogennego oraz zmniejszenie nasilenia zmian miażdżycowych w aorcie. Dodatkowo, zmniejszał on peroksydację lipidów i zwiększał stężenie GSH w wątrobie. Zmniejszał także stężenie cytokin prozapalnych w surowicy. Stwierdzono również istotny wzrost ekspresji PPAR alfa wskazujący na wzmożony katabolizm kwasów tłuszczowych w wątrobie. Jest to prawdopodobnie mechanizm, przez który badany liofilizat obniża stężenie trójglicerydów we krwi i zapobiega rozwojowi miażdżycy.

Obecnie trwają badania mające na celu określenie wpływu poszczególnych substancji czynnych, obecnych w owocach derenia właściwego, na gospodarkę lipidową oraz rozwój zmian miażdżycowych u zwierząt. Planujemy także kolejne badania z zakresu farmakokinetyki oraz badania oceniające interakcje derenia właściwego z innymi lekami na poziomie metabolizmu w wątrobie.

Efektom pracy nad tym tematem jest w chwili obecnej jeden patent, jedno zgłoszenie projektu wynalazczego oraz doniesienie zjazdowe. Zgłoszenie patentowe było trzykrotnie prezentowane i nagrodzone na targach wynalazczości.

8. Ocena działania przeciwłękowego fosfolipidów z żółtka jaja kurzego („super lecytyny”) w testach behawioralnych (projekt unijny: Innowacyjne technologie produkcji biopreparatów na bazie nowej generacji jaj (OVOCURA)) (badanie zamknięte)

Był to złożony projekt naukowo-badawczy realizowany w latach 2009-2012 w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, którego istotą były innowacyjne działania w obszarze produkcji nowej generacji jaj oraz nowoczesne technologie pozyskiwania biologicznie aktywnych substancji do zastosowań nutrafarmaceutycznych i biomedycznych w profilaktyce i terapii chorób cywilizacyjnych. Zadaniem zespołu pod kierownictwem Prof. Andrzeja Szuby było przeprowadzenie testów aktywności biologicznej i biomedycznej otrzymanych biopreparatów w badaniach na ssakach.

W ramach tego zadania badaliśmy działanie przeciwłękowe fosfolipidów z żółtka jaja kurzego („super lecytyny”). Fosfolipidy są podstawowymi składnikami neuronalnych błon komórkowych. Odgrywają kluczową rolę w procesach biochemicznych i fizjologicznych neuronów. Wykazano, że zaburzenia metabolizmu fosfolipidów w tkance nerwowej mają związek z zaburzeniami lękowymi i depresją.

Działanie przeciwłękowe i uspokajające tych związków oceniano w testach behawioralnych po 6 tygodniach suplementacji standardowej karmy podawanej szczurom szczepu Wistar Han. Wyniki przeprowadzonego doświadczenia (istotnie wydłużony czas przebywania w otwartych ramionach w teście podniesionego labiryntu krzyżowego oraz istotny wzrost liczby „karanych” prób pobierania wody w teście Vogla przy braku istotnych różnic w przebytych dystansie i średniej prędkości w teście otwartego pola) wskazują na wybiórcze działanie przeciwłękowe fosfolipidów („superlecytyna”), przy ich braku działania uspokajającego.

W kolejnym doświadczeniu badaliśmy działanie przeciwdepresyjne oleju z wątroby dorsza, fosfolipidów z żółtka jaja kurzego („super lecytyny”) i ich mieszaniny. Badania przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar Han w dwóch etapach. W pierwszym – zbadano działanie tych związków w modelu łagodnego przewlekłego stresu (chronic mild stress, CMS), w drugim – zbadano działanie samych fosfolipidów w teście wymuszonego pływania. W modelu CMS szczury przez 9 kolejnych tygodni narażone były na działanie łagodnych, nieprzewidywalnych stresorów, a następnie karmione badanymi związkami. W teście wymuszonego pływania działanie przeciwdepresyjne oceniano po 6 tygodniach suplementacji fosfolipidów. Nie wykazano działania przeciwdepresyjnego diety wzbogaconej w wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 ani w teście łagodnego przewlekłego stresu ani w teście wymuszonego pływania.

Wyniki pracy doświadczałnej naszego zespołu zostały opublikowane w jednej pracy oryginalnej, w której jestem drugim autorem oraz trzech doniesieniach zjazdowych

prezentowanych na konferencjach międzynarodowych. Przygotowywana jest druga praca oryginalna.

E. POZOSTAŁE INFORMACJE

A. Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy, z **wylączeniem** publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, obejmuje 45 publikacji w czasopiśmie recenzowanych o łącznej wartości IF: **19,702** oraz pkt. MNiSW/KBN: **341**

(371 łącznie z punktacją za prace oryginalne w suplemencie czasopisma *Pharmacol Rep*, w 2007 roku, które podlegały **takim samym procedurom peer review**, jak materiały publikowane w głównym czasopiśmie;
448 punktów łącznie z punktacją za 3 patenty oraz 1 zgłoszenie patentowe¹;))

- **Prace oryginalne:** 15 publikacji o łącznej wartości pkt MNiSW/KBN: **188**, w tym:
 - 10 publikacji z IF = **11,675** oraz pkt. MNiSW/KBN: **164**, z których w 1 jestem pierwszym, a w 6 drugim autorem
 - 5 publikacji bez IF, pkt. MNiSW/KBN: **24**, z których w 1 jestem pierwszym i w 1 drugim autorem
- **Artykuły poglądowe:** 27 publikacji o łącznej wartości pkt. MNiSW/KBN: **154**, w tym:
 - 4 publikacje z IF = **1,16**, pkt. MNiSW/KBN: **51**, z których w 2 jestem pierwszym autorem
 - 23 publikacje bez IF, pkt. MNiSW/KBN: **102**, z których w 5 jestem pierwszym, a w 7 drugim autorem
- **Rozdziały w monografiach, podręcznikach i skryptach:**
 - 4 pozycje, pkt. MNiSW/KBN: 11,
- **Publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism:**
 - 3 publikacje z IF = **6,87**, pkt. MNiSW/KBN: **30**,
(prace oryginalne podlegały **takim samym procedurom peer review**, jak materiały publikowane w głównym czasopiśmie)
- **Doniesienia zjazdowe ze zjazdów:**
 - międzynarodowych: 34

¹ Punktacja przyjęta przez Senacka Komisje Badań Naukowych w postanowieniach o ocenie dorobku naukowego pracowników akademii Medycznej, a następnie Uniwersytetu Medycznego, na zasadach określanych w kolejnych rozporządzeniach Ministra Nauki i Informatyzacji, a później Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Dz. U. z 2005 r. Nr 161, poz. 1359; Dz. U. z 2007 r. Nr 205, poz. 1489; Dz. U. z 1.08 2012 r., poz. 877).

- o krajowych: 3

Index Hirscha: 4 (wg. Web of Science)

Liczba cytowań: 65, w tym bez autocytoowań: 56 (wg. Web of Science)

B. Udział w konferencjach naukowych:

• Udział czynny (w 10 konferencjach):

- o Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego w Poznaniu (12-14.09.2004), Wrocławiu (6-8.09.2007), Krynicy-Zdroju (16-18.09.2010) i Kazimierzu Dolnym (23-25.05.2013)
- o VII Światowa Konferencja Europejskiego Towarzystwa Farmakologii Klinicznej i Farmakoterapii (IUPHAR), Florencja (15-20.2000)
- o Międzynarodowa Konferencja Grupy Motoryki Przewodu Pokarmowego, Żagań (26-27.09.2008)
- o XI Konferencja MipTec "The leading European event for drug discovery", Bazylea (14-16.10.2008).
- o XVI Europejski Tydzień Gastrologiczny (UEGF), Wiedeń (18-22.10.2008)
- o XVI Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Poznań (Polska, 24-26.11.2011)
- o Konferencja Europejskiego Towarzystwa Badań nad Wątrobą, Tallinn (22-23.06.2012)

• Udział bierny (w 24 konferencjach):

- o Sympozjum: Neuropsychofarmakologia 2000 – Dziś i Jutro (20-21.10.2000)
- o VIII Ogólnopolski Zjazd Towarzystwa Terapii Monitorowanej „ Jak leczyć skutecznie i bezpiecznie”, Wrocław (23-25.10.2003)
- o V Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmakologii Klinicznej i Terapii: Metody Molekularne w Farmakologii Klinicznej – od teorii do zastosowań, Poznań (19.11.2009)
- o XVII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Wrocław (26-28.09.2013)
- o Kongresy: Nadciśnienie Tętnicze, jako problem interdyscyplinarny we Wrocławiu (21-23.04.2005 i 19-21.04.2007) oraz Zjazdy Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego w Szczecinie (14-16.10.2010) i w Krakowie (18-20.10.2012)
- o Konferencje i sympozja naukowo-szkoleniowe z zakresu chorób wewnętrznych: IV Krajowa Konferencja Internistów Polskich, Warszawa (17-18.06.2005), Podsumowanie zmian w leczeniu cukrzycy, nadciśnienia tętniczego i stabilnej choroby wieńcowej, Wrocław (17.01.2009); Diagnostyka Chorób Zakaźnych, Warszawa (21.11.2008); Sympozjum naukowo-szkoleniowe: Zespół metaboliczny, Wrocław (18-19.11.2005)
- o Konferencje i sympozja naukowo-szkoleniowe z zakresu hipertensjologii i kardiologii: Nowe możliwości terapii Nadciśnienia tętniczego w 2008 roku, Wrocław (7.03.2008); Konferencja Kardiologii Polskiej, Poznań (6-

- 7.02.2009); Wielkopolskie Dni Hipertensjologii w Poznaniu (19-20.10.2007, 6-7.11.2009); Jak skutecznie leczyć nadciśnienie tętnicze? Wrocław (3.04.2009); Sympozjum Naukowo-Szkoleniowe Nadciśnienie Tętnicze, standardy postępowania, najnowsze doniesienia, Wrocław (5.02.2011, 25.02.2012, 23.12.2013); Repetytorium z Hipertensjologii w Warszawie (11.09.2010) i dwukrotnie we Wrocławiu (8.04.2010 i 16.11.2013); IX Konferencja Dydaktyczna Czasopisma „Nadciśnienie Tętnicze, Warszaw (21-22.05.2010), IX Konferencja Czasopisma „Cardiology Journal”: 2013 – rok sześciu nowych wytycznych ESC/PTK, Warszawa (22-23.03.2013)
- Kurs podsumowujący pt. Standardy w Echokardiografii – Szkolenie akredytacyjne sekcji echokardiografii PTK, 23.11.2013, Katowice, Polska
 - Prezentacja ustna na XVI Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK w Poznaniu (24-26.11.2011): „Influence of ezetimibe on antioxidant parameters in rat liver subjected to ischemia/reperfusion”.
 - Wykład na zaproszenie organizatorów na Międzynarodowej Konferencji Grupy Motoryki Przewodu Pokarmowego w Żaganiu (26-27.09.2008): Modele eksperymentalne zaburzeń motoryki przewody pokarmowego
 - Wygłoszone referaty na Posiedzeniach PTF:
 - 26.03.2003 Posiedzenie naukowe Wrocławskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego, Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego i Towarzystwa Terapii Monitorowanej: Hepatotoksyczność wybranych leków.
 - 26.01.2005 Posiedzenie naukowe Wrocławskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego, Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego i Towarzystwa Terapii Monitorowanej: Wpływ leków blokujących kanały wapniowe na wątrobę szczurzą przechowywaną do przeszczepienia.

C. Udział w projektach badawczych

- 1.10.2000-31.12.2001 – kierownik projektu w ramach badań własnych uczelni (564): Badania nad zastosowaniem antagonistów receptorów H₃-histaminowych w hamowaniu łaknienia
- 1.10.2000-31.12.2001 – członek zespołu badawczego projektu w ramach badań własnych uczelni (563): Rola receptorów H₃-histaminowych w regulacji spożycia etanolu
- 2000-2001 – członek zespołu badawczego grantu 565: Wpływ agonisty receptora alfa2/II na ciśnienie wewnątrzgałkowe u królików.
- 2004 – członek zespołu badawczego grantu 1012: Wpływ inhibitora wewnątrzkomórkowego wiązania histaminy (DPPE) na proliferację wybranych linii komórkowych
- 1.10.2007-31.12.2009 – kierownik projektu ST-49: Wpływ inhibitora reduktazy hydroksymetyloglutarylo-CoA (simwastatyny) podawanego przewlekle na

aktywność układu oksydoredukcyjnego wątroby w warunkach niedokrwienia i reperfuzji

- 1.01.2009-31.12.2010 – członek zespołu badawczego ST-346: Wpływ flawonoidów na indukowaną lekami immunosupresyjnymi (np. cyklofosfamidem) toksyczność narządową, stres oksydacyjny i parametry układu immunologicznego
- 1.01.2009-31.12.2010 – członek zespołu badawczego ST348: Porównanie wpływu naturalnych flawonoidów moryny i kwercetyny oraz ich rozpuszczalnych w wodzie soli (soli sodowej kwasu kwercytyno-5-sulfonowego i soli sodowej kwasu moryno-5-sulfonowego) na wybrane parametry układu oksydoredukcyjnego u myszy zatrutych kadmem
- 1.01.2006-31.12.2008 – członek projektu PB-1414: Wpływ antybiotyków makrolidowych – erytromycyny i roksytromycyny oraz drogi ich podawania na rozwój przeszczepionego myszom czerniaka linii B16F10
- 1.01.2009-31.12.2010 – członek projektu 1908: Wpływ omeprazolu i ranitydyny na biodostępność winpocetyny po podaniu doustnym u szczurów
- 1.01.2011-31.12.2013 – kierownik projektu ST-555: Wpływ wybranych substancji na funkcję i strukturę narządów, parametry stresu oksydacyjnego i układu tlenu azotu w warunkach fizjologicznych i w różnych stanach chorobowych
- Projekt unijny realizowany w okresie od 26.02.2009 do 31.03.2013: Innowacyjne technologie produkcji biopreparatów na bazie nowej generacji jaj (OVOCURA); nr POIG.01.03.01-00-133/08
- Projekt unijny realizowany latach 2010-2011 w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, współfinansowany przez UE ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego UDA-POIG.01.01.01-02-011/09-00. Tytuł: Lider Obszaru Badawczego "Biotechnologia i Farmaceutyka" projektu „Identyfikacja potencjału i zasobów Dolnego Śląska w obszarze nauka i technologie na rzecz poprawy jakości życia (Quality of Life) oraz wytyczenie przyszłych kierunków rozwoju. Badania metodami foresight”

D. Patenty i zgłoszenia patentowe²

- 27.05.2013 – Współautor Patentu (Pat. 215664): „Urządzenie do krótkotrwałego unieruchomienia gryzoni w celu pobrania krwi” (pkt. MNiSW/KBN: 25¹)
- 11.08.2011 – Współautor Patentu (P-395934): „Zastosowanie derenia właściwego *Cornus mas L.* lub jego tkanek lub ich wytworów” (pkt. MNiSW/KBN: 25¹)
- 01.08.2012 – Współautor Zgłoszenia Patentowego (P-400211): Zastosowanie preparatu z odmiany uprawnej derenia właściwego *Cornus mas L.* wyselekcjonowanej w Europie do utrzymania fizjologicznego stężenia oraz obniżania poziomu lipidów, zwłaszcza trójglicerydów. (pkt. MNiSW/KBN: 2¹)

² Punktacja przyjęta przez Senacka Komisję Badań Naukowych w postanowieniach o ocenie dorobku naukowego pracowników akademii Medycznej, a następnie Uniwersytetu Medycznego, na zasadach określanych w kolejnych rozporządzeniach Ministra Nauki i Informatyzacji, a później Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Dz. U. z 2005 r. Nr 161, poz. 1359; Dz. U. z 2007 r. Nr 205, poz. 1489; Dz. U. z 1.08.2012 r., poz. 877).

- Prezentacja wynalazku na 61 Międzynarodowych Targach Wynalazczości, Badań Naukowych i Nowych Technik w Brukseli. European cultivars of Cornelian cherry (*Cornus mas L.*) for prevention and treatment of atherosclerosis – novel plant product decreasing serum triglycerides. - Brussels INNOVA 2012, 15-17.11.2012. Brussels Expo (Heysel) 2012; s.45-46 poz.29 – nagrodzony srebrnym medalem i dyplomem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego
- Prezentacja wynalazku na Międzynarodowych Targach Innowacji i Nowych Technologii Inno-Tech Expo 2013, Kielce, 17-19.10.2013
- Prezentacja wynalazku na Targach Innowacji i Przedsiębiorczości 4 FUTURE we Wrocławiu, 23-24 październik 2013
- 04.12.2012 – Współautor Patentu (P-401894): „Zastosowanie preparatu fosfolipidowego z żółtka jaj” (pkt. MNiSW/KBN: 25¹)

E. Szkolenia i kursy

- Instytut Farmakologii PAN, ul. Smętna 12, Kraków, Polska: 20-24.03.2000
- Instytut Farmakologii PAN, ul. Smętna 12, Kraków, Polska: 16-19.10.2000
- Roztoczańska Szkoła Ultrasonografii, Zamość, Polska: 2-7.09.2012
- I Warsztaty Lipidologiczne w ramach Ogólnopolskiego Forum zaburzeń Lipidowych, 12-13.12.2013 Warszawa, Polska

F. Recenzowanie publikacji w czasopismach:

- 27.09.2011 – recenzja pracy oryginalnej pt.: “The assessment of selected biochemical parameters in the serum of rats treated with mianserin and simvastatin” dla czasopisma Pharmacological Reports; IF: 2.445
- 9.01.2012 – recenzja pracy oryginalnej pt.: “The clinical significance sympathetic overactivity in patients with systemic sclerosis: Reverse dipper pattern of blood pressure and ADMA” dla czasopisma African Journal of Pharmacy and Pharmacology; IF: 0.84

G. Działalność dydaktyczna

- Jako pracownik naukowo-dydaktyczny Katedry i Zakładu Farmakologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu prowadzę zajęcia dydaktyczne z zakresu:
 - „Farmakologia i toksykologia” na Wydziale Lekarskim (IV rok) oraz „Farmakologia” na Wydziale Lekarsko-Stomatologicznym (III rok), w tym również dla English Division
 - „Farmakologia z farmakodynamiką” na Wydziale Farmaceutycznym (IV rok)
- Wykłady w ramach kursów organizowanych przez Studium Szkolenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego AM we Wrocławiu w latach: 2005 – 2010
- Dolnośląski Festiwal Nauki, 2004 r.

(M. Trocha, A. Merwid-Ląd, E. Chlebda, A. Szełąg et al. Katedra i Zakład Farmakologii, Akademia Medyczna)

Sesja: Co powinniśmy wiedzieć o lekach?

- Czy wszystkie leki są bezpieczne dla mojej wątroby?
- Paracetamol – lek popularny, ale mało znany
- Leki przeciwbólowe – co każdy wiedzieć powinien
- Co wskazuje, że mam alergię na leki?

H. Działalność w komitetach organizacyjnych

- Członek Komitetu Organizacyjnego XVI Międzynarodowego Kongresu Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego, Wrocław, 6-8.09.2007

I. Działalność w zawodzie lekarza

Oprócz działalności naukowo-badawczej i dydaktycznej związanej z moim podstawowym miejscem pracy w Katedrze i Zakładzie Farmakologii, w latach 1995 – 2011 związana byłam z Kliniką Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego UM we Wrocławiu, gdzie w trakcie studiów pracowałam jako wolontariusz, a po ukończeniu studiów odbyłam roczny staż podyplomowy. Następnie, pod kierownictwem Pani Prof. Anny Skoczyńskiej, odbyłam szkolenie specjalizacyjne z chorób wewnętrznych, a pod kierownictwem Pana Prof. Andrzeja Szuby – szkolenie specjalizacyjne z hipertensjologii.

Obecnie pracuję w lecznictwie otwartym prowadząc Poradnię Internistyczną i Nadciśnienia Tętniczego. Zajmuję się także oceną przesiewowej polisomnografii, interpretacją badania ABPM, wykonuję testy wysiłkowe oraz badania echokardiograficzne.

J. Członkostwo w krajowych i europejskich towarzystwach naukowych

- Polskie Towarzystwo Farmakologiczne
- Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego
- Polskie Towarzystwo Kardiologiczne
- Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne
- Polskie Towarzystwo Lipidologiczne

K. Nagrody i wyróżnienia

- 05.12.1997 – List wyróżniający z bardzo dobre wyniki w nauce, wzorowe wypełnianie obowiązków studenta oraz nienaganną postawę etyczną
- 2007 rok – Indywidualna nagroda naukowa II stopnia J.M. Rektora za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej: za pracę doktorską pt.: „Wpływ leków blokujących kanały wapniowe na wątrobę szczurzą przechowywaną do przeszczepienia”
- 2012 rok – Indywidualna nagroda naukowa II stopnia J.M. Rektora za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej: za cykl prac opublikowanych w 2010 roku.

- 2010-2011 – Stypendium naukowe dla post-doc w ramach PROGRAMU ROZWOJU AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU” Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego UDA-POKL. 04.01.01-00-010/08-01
- 17.11.2012 – Srebrny Medal na Światowych Targach Wynalazczości, Badań Naukowych i Nowych Technik, BRUSSELS EUREKA! za projekt: Zastosowanie preparatu z odmiany uprawnej derenia właściwego (*Cornus mas L.*), wyselekcjonowanej w Europie do utrzymania fizjologicznego stężenia oraz obniżania poziomu lipidów, zwłaszcza trójglicerydów.
- 02.2013 – Dyplom Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, list gratulacyjny Prof. Barbary Kudryckiej, za projekt pod nazwą: Zastosowanie preparatu z odmiany uprawnej derenia właściwego (*Cornus mas L.*), wyselekcjonowanej w Europie do utrzymania fizjologicznego stężenia oraz obniżania poziomu lipidów, zwłaszcza trójglicerydów.

Małgorzata
Trocha