

**Jacek Drobniak**

# Autoreferat

### **1. Imię i Nazwisko.**

Jacek Henryk Drobnik

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

- 1989 Dyplom lekarza (Akademia Medyczna w Łodzi, Wydział Lekarski).
- 1992 Stopień naukowy: doktor nauk medycznych (Akademia Medyczna w Łodzi, Wydział Lekarski).

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ melatoniny na poziom niektórych elementów tkanki łącznej w gojących się ranach u szczurów.”

- 1999 Uzyskanie pierwszego stopnia specjalizacji w zakresie chorób wewnętrznych.

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

- 1989-2006 Zakład Patofizjologii, Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Narutowicza 60, 90-136, Łódź.  
1989-1998 asystent  
1999- 2012 adiunkt
- 2006-2010r Zakład Metabolizmu Tkanki Łącznej, Katedra Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi ul. Narutowicza 60, 90-136, Łódź (p.o. kierownika zakładu).
- 2010-2011 Pracownia Metabolizmu Tkanki Łącznej, Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Katedra Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Narutowicza 60, 90-136, Łódź. (kierownik pracowni).
- 2012- Pracownia Metabolizmu Tkanki Łącznej, Zakład Badań Neuropeptydów, Katedra Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Narutowicza 60, 90-136, Łódź (kierownik pracowni).  
Od 2012r starszy wykładowca.

#### **Punktacja za publikacje:**

- Suma punktów MNiSW za artykuły oryginalne wynosi 307 (IF=26,926) w tym, jako pierwszy autor 162 (IF=16,61).
- Liczba cytowań 120 (Web of Science) lub 140 (Scopus).
- Indeks Hirsha 6 (Web of Science) lub 7 (Scopus).

**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.):**

Główne osiągnięcie naukowe dotyczy badań wpływu szyszynki na zawartość kolagenu i glikozoaminoglikanów w sercu po zawale. Eksperymenty były dotowane przez Komitet Badań Naukowych (grant nr 3P05A 005 24) oraz Uniwersytet Medyczny w Łodzi (grant nr 502-11-566). Wyniki badań będące podstawą rozprawy habilitacyjnej („Wpływ szyszynki na zawartość kolagenu i glikozoaminoglikanów w sercu po zawale.”) stanowią cykl 5 publikacji.

**a) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),**

1) **Drobnik J**, Karbownik-Lewińska M, Szczepanowska A, Słotwińska D, Olczak S, Jakubowski L, Dąbrowski R. Regulatory influence of melatonin on collagen accumulation in the infarcted heart scar. *J Pineal Res* 2008; 45:285-290. IF=5.09, Pkt. MNiSzW =24.

Wkład pracy J Drobniaka wynosi 78 % i obejmuje: opracowanie własnej koncepcji badań, wykonanie pinealektomii lub operacji pozorowanej, wstrzyknięcia badanych substancji, asystę przy podwiązaniu lewej tętnicy wieńcowej celem wywołania zawału serca u szczurów, pobranie materiału do badań biochemicznych i hodowli komórkowych, ocenę wielkości zawału, izolację miofibroblastów z blizny pozawałowej i prowadzenie hodowli komórkowych, określenie ilości komórek w hodowli, pobranie hodowli komórkowych do badań biochemicznych, pobranie i wstępne utrwalenie komórek do badań w mikroskopie elektronowym, opracowanie wyników i przygotowanie manuskryptu do publikacji.

2) **Drobnik J**, Olczak S, Owczarek K, Hrabec Z, Hrabec E. Melatonin augments expression of the procollagen  $\alpha 1$  (I) and  $\alpha 1$  (III) genes, in the infarcted heart scar of pinealectomised rats. *Connective Tissue Res* 2010; 51:491-496. IF=2,093, Pkt. MNiSzW =32.

Wkład pracy J Drobniaka stanowi 80 % i obejmuje: opracowanie własnej koncepcji badań, prowadzenie doświadczeń na zwierzętach, wykonanie pinealektomii lub operacji pozorowanej, wstrzyknięcia melatoniny, asystę przy podwiązaniu lewej tętnicy wieńcowej, pobranie materiału do badań molekularnych, izolację miofibroblastów z blizny pozawałowej i prowadzenie hodowli komórkowych, określenie ilości komórek w hodowli, pobranie hodowli komórkowych do badań molekularnych, izolacja RNA z blizny pozawałowej lub hodowanych komórek, przeprowadzenie Rt PCR, opracowanie wyników i przygotowanie manuskryptu do publikacji.

3) **Drobnik J**, Słotwińska D, Olczak S, Tosik D, Pieniążek A, Matczak K, Koceva-Chyła A, Szczepanowska A. Pharmacological doses of melatonin reduce the glycosaminoglycan level

within the infarcted heart scar. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62 (1):29-35. IF=2.267 Pkt. MNiSzW=25.

Wkład pracy J Drobnika wynosi 65 % i obejmuje: opracowanie własnej koncepcji badań, wstrzyknięcia badanych substancji, asystę przy podwiązaniu lewej tętnicy wieńcowej, pobranie materiału do badań biochemicznych i hodowli komórkowych, ocenę wielkości zawału, izolację miofibroblastów z blizny pozawałowej i prowadzenie hodowli komórkowych, określenie ilości komórek w hodowli, pobranie hodowli komórkowych do badań biochemicznych i ich identyfikacji, pobranie i wstępne utrwalenie komórek do badań w mikroskopie elektronowym, opracowanie wyników i przygotowanie manuskryptu do publikacji.

4) **Drobnik J**, Owczarek K, Piera L, Tosik D, Olczak S, Ciosek J, Hrabec E. Melatonin-induced augmentation of collagen deposition in cultures of fibroblasts and myofibroblasts is blocked by luzindole – melatonin membrane receptors inhibitor. *Pharmacol Rep* 2013; 65(3): 642-649. IF=1.965, Pkt. MNiSzW=25.

Wkład pracy J Drobnika wynosi 75 % i obejmuje: opracowanie własnej koncepcji badań, asystę przy podwiązaniu lewej tętnicy wieńcowej celem wywołania zawału serca u szczurów, wszczepienie podskórne siatek polipropylenowych, jako modelu rany powierzchniowej, pobranie materiału do hodowli komórkowych, izolację miofibroblastów z blizny pozawałowej oraz miofibroblastów i fibroblastów z ziarniny ran powierzchniowych i prowadzenie hodowli komórkowych, określenie ilości komórek w hodowli, pobranie hodowli komórkowych do badań biochemicznych, wstępne utrwalenie komórek do badań w mikroskopie elektronowym, opracowanie wyników i przygotowanie manuskryptu do publikacji.

5) **Drobnik J**, Tosik D, Piera L, Szczepanowska A, Olczak S, Zielińska A, Liberski PP, Ciosek J. Melatonin-induced glycosaminoglycans augmentation in myocardium remote to infarction. *J Physiol Pharmacol* 2013, 64(6):737-744. IF=2,476, Pkt. MNiSzW=20.

Wkład pracy J Drobnika wynosi 72 % i obejmuje: opracowanie własnej koncepcji badań, asystę przy podwiązaniu lewej tętnicy wieńcowej, wstrzykiwanie melatoniny, określenie wielkości zawału oraz pobranie blizn i niezawałowej części mięśnia lewej komory do oznaczeń biochemicznych, pobranie materiału do hodowli komórkowych, izolację fibroblastów z nie objętej zawałem części mięśnia lewej komory i prowadzenie hodowli komórkowych, określenie ilości komórek w hodowli, pobranie hodowli komórkowych do badań biochemicznych, pobranie i wstępne utrwalenie komórek do badań w mikroskopie elektronowym, opracowanie wyników i przygotowanie manuskryptu do publikacji.

Suma punktów za cykl publikacji stanowiących rozprawę habilitacyjną: pkt. MNiSzW = 126 (IF=13,891).

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

Już od lat 60 ubiegłego wieku zaczęto interesować się regulacyjnym wpływem szyszynki na procesy akumulacji kolagenu w tkankach. Zwiększone włóknienie w przestrzeni zaotrzewnowej (Elkind i wsp., 1968) oraz serca i płuc (Graham, 1967) u ludzi leczonych methysergidem łączono z faktem, iż lek ten jest antagonistą serotoniny, która jest substratem dla produkcji melatoniny. Uważano, zatem, że opisywane nadmierne włóknienie narządów jest efektem hamowania syntezy melatoniny. Cunnane i współpracownicy (1979) zaobserwowali nadmierne włóknienie w przestrzeni zaotrzewnowej u pinealektomizowanych szczurów, sugerując, że obniżenie poziomu melatoniny w krwi jest przyczyną zwiększonego włóknienia. Ponadto, u pinealektomizowanych szczurów stwierdzono hamowanie produkcji prostaglandyny E1 (PGE1). Ponieważ, PGE1 jest inhibitorem syntezy kolagenu, sądzono, że fakt ten może wyjaśniać zwiększone włóknienie u zwierząt pozbawionych szyszynki.

Podawanie melatoniny w dawce 30 µg/100 g p.m.c. zmniejszało poziom białka kolagenowego w ziarninie pobranej z ran powierzchniowych. Pinealektomia powodowała przeciwny efekt i podwyższała zawartość kolagenu w ranach. Natomiast, podanie melatoniny w dawce 30 µg/100 g m.c., pinealektomizowanym szczurom, odwracało efekt pinealektomii i normalizowało zawartość kolagenu w ziarninie ran (Drobnik i wsp., 1995, 1996). Dawka ta wywoływała efekt równoważny działaniu endogennej melatoniny. U szczurów przetrzymywanych w warunkach ciągłej ciemności stwierdzono opóźnienie gojenia ran oraz zmniejszenie poziomu kolagenu w ziarninie (Drobnik i wsp., 1995). Mimo, że u zwierząt przebywających w ciągłej ciemności rytm wydzielania melatoniny jest zachowany to jednak międzyszczytowy poziom tego hormonu jest podwyższony (Hansson i wsp., 1990, Lincoln i wsp., 1985). Przypuszcza się, że wydzielana w ciemności melatonina jest odpowiedzialna za opóźnienie gojenia ran powierzchniowych i obniżenie zawartości kolagenu w ziarninie ran.

Ostateczny efekt melatoniny jest zależny od pory podania hormonu. Poranne wstrzyknięcie melatoniny w dawce 30 µg/100 g m.c. podwyższa zawartość białka kolagenowego w ziarninie ran powierzchniowych. Natomiast hormon szyszynki podawany wieczorem w tej samej dawce obniżał zawartość kolagenu w ziarninie ran. Doświadczenie to pokazuje, że odpowiedź komórek na podanie hormonu szyszynki zmienia się w ciągu doby

(Drobnik i Dąbrowski, 2000). Zjawisko to może wynikać z różnicy gęstości receptorów dla melatoniny zaobserwowanej w godzinach porannych i wieczornych (Gauer i wsp., 1994).

Stosowanie melatoniny (30  $\mu\text{g}/100$  g m.c) w godzinach wieczornych zmniejszało poziom hydroksyproliny w zespoleniach jelitowych u szczurów (Bulbuler i wsp., 2005). Zjawisku temu towarzyszyła zmniejszona oporność mechaniczna ran. U pinealektomizowanych zwierząt poziom hydroksyproliny w ranach jelit ulegał zwiększeniu natomiast podanie melatoniny szczurom z usuniętą szyszynką normalizowało poziom hydroksyproliny oraz właściwości mechaniczne ran (Bulbuler i wsp., 2005). W tym samym modelu doświadczalnym badano również cięte rany skórne. Melatonina powodowała spadek poziomu hydroksyproliny i zmniejszała oporność mechaniczną ciętych ran skórnych. Efektem pinealektomii był wzrost zawartości hydroksyproliny i zwiększona oporność rany na zrywanie. Natomiast suplementacja melatoniną pinealektomizowanych szczurów normalizowała zawartość hydroksyproliny oraz właściwości mechaniczne ran. W ranie indukowanej niedokrwieniem melatonina w dawce 100  $\mu\text{g}/100$  g m.c nie zmieniała poziomu hydroksyproliny w środowisku rany (Ozler i wsp., 2011).

Wpływ hormonu szyszynki badany był u szczurów, którym podawano dimetylonitrozoaminę wywołującą uszkodzenie i włóknienie wątroby. Melatonina stosowana w dawce 100 mg/kg m.c. zmniejszała poziom hydroksyproliny w wątrobie szczurów traktowanych dimetylonitrozoaminą (Tahan i wsp., 2004). Podobny efekt, obniżania zawartości hydroksyproliny zaobserwowano u szczurów z poalkoholowym uszkodzeniem wątroby (Ustuntag i wsp., 2000). Ponadto, melatonina hamowała włóknienie i obniżała parametry stresu oksydacyjnego w wątrobie z podwiązanymi przewodami żółciowymi (Tahan i wsp., 2010).

Śródskórne wstrzyknięcia melatoniny w dawce 1.2 mg/kg m.c. powodowały lepsze gojenie skórnych ran ciętych oraz poprawiały jakość bliznowacenia w 14 i 21 dniu gojenia. W ranach traktowanych melatoniną włókna kolagenowe bardziej przypominały te, które znajdują się w nieuszkodzonej skórze (Pugazenthi i wsp., 2008). Ponadto, melatonina wywierała również regulacyjny wpływ na poziom kolagenu w nieuszkodzonej skórze szczurów. Hormon szyszynki w dawce 30  $\mu\text{g}/100$  g m.c., obniżał zawartość kolagenu w skórze, pinealektomia zwiększała poziom tego białka, natomiast stosowanie melatoniny u pinealektomizowanych zwierząt normalizowało zawartość kolagenu (Drobnik i Dąbrowski, 1999).

Melatonina (30 mg/kg m.c.) przyspieszała gojenie złamań kości u szczurów. Efekt ten potwierdziły badania radiologiczne i histologiczne (Halici i wsp., 2010). Ponadto hormon szyszynki zwiększał syntezę kolagenu typu I w hodowlach osteoblastów (Nakade i wsp., 1999).

U zwierząt pinealektomizowanych stwierdzono statystycznie istotne zwiększenie poziomu chondroityno-4-siarczanu w ranach. Natomiast u szczurów traktowanych melatoniną dostrzeżono tendencję do wzrostu poziomu chondroityno-4-siarczanu. Efekt ten nie był istotny statystycznie (Drobnik i wsp., 1995).

Powyższe badania dokumentują regulacyjny wpływ melatoniny na zawartość białka kolagenowego, zaobserwowany w różnych modelach doświadczalnych. Działanie melatoniny obserwowano w ranach powierzchniowych (Drobnik i wsp., 1995, 1996, 1999), skórnych ranach ciętych, zespoleniach jelitowych (Bulbuler i wsp., 2005), hodowlach osteoblastów (Nakade i wsp., 1999), modelach zwłóknienia wątroby (Tahan i wsp., 2004; Ustuntag i wsp., 2000) oraz w nieuszkodzonej skórze (Drobnik i Dąbrowski, 1999). Efekt melatoniny był zależny od dawki, pory podania hormonu oraz narządu docelowego.

Celem obecnych badań było sprawdzenie czy melatonina wywiera regulacyjny wpływ na zawartość kolagenu i glikoaminoglikanów w bliźnie pozawałowej serca i nie objętej zawałem części mięśnia lewej komory. Ponadto podjąłem próbę określenia mechanizmu działania hormonu szyszynki.

W pierwszej publikacji (Drobnik i wsp., 2008) wykazałem, że melatonina stosowana wieczorem w dawkach 30  $\mu\text{g}/100$  g m.c i 60  $\mu\text{g}/100$  g m.c. zwiększała poziom białka kolagenowego w bliźnie pozawałowej serca szczurów. Pozostałe dawki (3  $\mu\text{g}/100$  g m.c. i 300  $\mu\text{g}/100$  g m.c.) nie były efektywne. Natomiast chirurgiczna pinealektomia wywoływała efekt przeciwny do podania melatoniny i obniżała zawartość kolagenu w bliźnie pozawałowej. Wstrzyknięcia melatoniny pinealektomizowanym szczurom w dawce 30  $\mu\text{g}/100$  g m.c. nie powodowały normalizacji poziomu kolagenu w bliźnie pozawałowej.

Dane literaturowe dowodzą, że wieczorne wstrzyknięcia  $\beta$ -blokerów powodowały spadek nocnego poziomu melatoniny we krwi. Podawanie atenololu w godzinach wieczornych, określane jako pinealektomia farmakologiczna, powodowało (podobnie jak pinealektomia chirurgiczna) zmniejszenie poziomu kolagenu w bliźnie pozawałowej w porównaniu z grupą kontrolną oraz zwierzętami otrzymującymi atenolol w godzinach porannych (grupa ta jest kontrolą dla pozaszyszynkowych efektów atenololu, ponieważ poranne wstrzyknięcia leku nie blokowały nocnego wyrzutu hormonu szyszynki).

Wstrzykiwanie melatoniny w dawce 30  $\mu\text{g}/100\text{ g m.c.}$  szczurom, którym podawano atenolol nie normalizowało poziomu kolagenu w bliźnie. Ponieważ stosowanie melatoniny w dawce 30  $\mu\text{g}/100\text{ g m.c.}$  u pinealektomizowanych szczurów nie normalizowało poziomu kolagenu w bliźnie pozawałowej, w późniejszych badaniach zastosowaliśmy wyższe dawki melatoniny, które były podawane zwierzętom pinealektomizowanym. W eksperymentach tych wykazaliśmy, że dawka 60  $\mu\text{g}/100\text{ g m.c.}$  hormonu szyszynki normalizuje poziom kolagenu w bliźnie pozawałowej i odwraca efekt pinealektomii chirurgicznej i farmakologicznej. Doświadczenia te pokazały, że melatonina wpływa na poziom kolagenu w bliźnie pozawałowej serca. Następne eksperymenty udowodniły, że melatonina również w warunkach *in vitro* podwyższa zawartość białka kolagenowego w hodowlach miofibroblastów pobranych z blizny pozawałowej. Wzrost poziomu kolagenu, powodowany przez melatoninę, w bliznach pozawałowych szczurów wynika zatem z bezpośredniego działania hormonu szyszynki na komórki syntetyzujące kolagen w bliźnie pozawałowej.

Kolejne badania (Drobnik i wsp., 2010) pokazały, że wstrzyknięcia melatoniny nie zmieniają poziomu mRNA dla łańcuchów  $\alpha 1$  prokolagenu typu I i III. Ponadto u zwierząt poddanych pinealektomii chirurgicznej nie stwierdzono również zmian poziomu badanego mRNA. Poziom mRNA dla łańcuchów  $\alpha 1$  prokolagenu typu I i III wzrastał u szczurów pinealektomizowanych, którym wstrzykiwano melatoninę (60  $\mu\text{g}/100\text{ g m.c.}$ ). Doświadczenie to wskazuje na istnienie odrębnego mechanizmu działania melatoniny u zwierząt pinealektomizowanych i szczurów z zachowaną szyszynką.

Stosowanie farmakologicznych dawek melatoniny (Drobnik i wsp., 2011) powodowało spadek poziomu glikozoaminoglikanów w bliźnie pozawałowej serca bez zmian zawartości białka kolagenowego. Wykazano również, że stosowane dawki melatoniny zmniejszają peroksydację lipidów, podwyższają zawartość grup SH w białkach i poziom zredukowanego glutationu w bliźnie pozawałowej. Jest to pierwsza praca pokazująca efekt antyoksydacyjny melatoniny, w modelu zawału serca, indukowanym przez trwałe podwiązanie tętnicy wieńcowej. Poprzednie doniesienia dotyczyły antyoksydacyjnego działania hormonu szyszynki w warunkach niedokrwienia i reperfuzji. W hodowlach miofibroblastów melatonina podwyższała zawartość glikozoaminoglikanów. W oparciu o rozbieżność efektów *in vivo* i *in vitro* postawiłem hipotezę, że obniżanie poziomu glikozaminoglikanów widoczne w bliznach pozawałowych szczurów nie wynika z bezpośredniego działania hormonu na miofibroblasty blizny.



Dotychczasowe wyniki badań wskazują na fakt, że regulacja poziomu kolagenu przez melatoninę jest zależna od narządu docelowego (Drobnik, 2011). Melatonina obniża poziom kolagenu w ranach powierzchniowych (Drobnik i wsp., 1995, 1996, 2000, Bulbuler i wsp., 2005), nieuszkodzonej skórze (Drobnik i wsp., 1999) oraz wątrobie (Ustuntag i wsp., 1999, Taran i wsp., 2004). Natomiast w bliznach pozawałowych, hodowlach miofibroblastów pobranych z tych blizn (Drobnik i wsp., 2008) oraz hodowlach osteoblastów (Nakade i wsp., 1999) hormon szyszynki podwyższa zawartość białka kolagenowego. Celem tej części badań jest wyjaśnienie czy różne efekty melatoniny w bliznie pozawałowej i ranach powierzchniowych są wynikiem odmiennej odpowiedzi komórek izolowanych z badanych ran oraz określenie czy efekt melatoniny może być blokowany przez luzindol (nieselektywny inhibitor błonowych receptorów dla melatoniny). Pobrane z blizny pozawałowej komórki zidentyfikowano jako miofibroblasty na podstawie badań w mikroskopie elektronowym. Komórki te posiadały typowe dla miofibroblastów organella komórkowe (podbłonowe kaweole oraz wiązki włókien równoległe ułożonych do plazmolemmy). Natomiast komórki pobrane z ziarniny ran powierzchniowych scharakteryzowano jako fibroblasty z domieszką miofibroblastów. Melatonina powodowała wzrost poziomu kolagenu w hodowlach miofibroblastów pobranych z blizny pozawałowej. Efekt ten był hamowany przez luzindol nieselektywny inhibitor błonowych receptorów dla melatoniny. Doświadczenie to pokazuje, że indukowany przez melatoninę wzrost poziomu białka kolagenowego w bliznie pozawałowej szczurów jest efektem bezpośredniego wpływu melatoniny na miofibroblasty, a hamowanie tego wpływu przez luzindol, dowodzi, że jest on zależny od aktywacji błonowych receptorów dla melatoniny. W hodowli komórek pobranych z ziarniny ran powierzchniowych melatonina również podwyższała zawartość kolagenu w hodowli, a luzindol hamował ten efekt. Wyniki te pokazują, że efekt melatoniny obniżający poziom kolagenu w ziarninie ran powierzchniowych w warunkach *in vivo* nie jest efektem bezpośredniego działania hormonu szyszynki na fibroblasty rany. Sformułowałem hipotezę, że działanie to może wynikać z modyfikacji, wywieranej przez melatoninę, układów regulujących gojenie ran (układ immunologiczny, dokrewny i nerwowy).

W ostatniej części badań sprawdzałem czy melatonina może modyfikować zawartość macierzy pozakomórkowej w nie objętej zawałem części mięśnia lewej komory. Ponadto, podjąłem próbę wyjaśnienia mechanizmu działania melatoniny. Melatonina w dawce 60 µg/100 g m.c. zwiększała zawartość glikozoaminoglikanów w nie zawałowej części mięśnia lewej komory. Natomiast, poziom kolagenu nie ulegał zmianie pod wpływem badanego hormonu szyszynki. Z mięśnia lewej komory nie objętej zawałem wyizolowano komórki

niemięśniowe, które zidentyfikowano jako fibroblasty. W hodowlach tych komórek melatonina podwyższała poziom glikozoaminoglikanów. Efekt ten hamowany był przez luzindol. Doświadczenia te wskazują na fakt, że efekt melatoniny obserwowany *in vivo* był zależny od bezpośredniego działania hormonu na fibroblasty nie objętej zawalem części mięśnia lewej komory oraz sugerują udział aktywacji receptorów błonowych w regulacji poziomu glikozoaminoglikanów w badanej części mięśnia lewej komory.

## WNIOSKI

1. Melatonina wywiera regulacyjny wpływ na poziom białka kolagenowego w bliźnie po zawale mięśnia sercowego.
2. Mechanizm działania melatoniny u zwierząt z nieuszkodzoną szyszynką i pinealektomizowanych jest różny. Melatonina podwyższa poziom mRNA dla łańcuchów  $\alpha 1$  prokolagenów typu I i III u pinealektomizowanych szczurów. Efektu tego nie obserwuje się u zwierząt z zachowaną szyszynką. Ekspresja genów łańcuchów  $\alpha 1$  kolagenów typu I i III podlega wpływowi melatoniny u pinealektomizowanych szczurów.
3. Melatonina obniża poziom GAG w bliźnie pozawałowej. Efekt ten nie jest zależny od bezpośredniego wpływu hormonu szyszynki na miofibroblasty blizny.
4. Melatonina, stosowana w dawkach farmakologicznych, wywiera działanie antyoksydacyjne w bliźnie pozawałowej serca powstałej na skutek trwałego podwiązania tętnicy wieńcowej.
5. Wzrost zawartości kolagenu w bliznach pozawałowych jest wynikiem bezpośredniego wpływu melatoniny na miofibroblasty. Efekt ten jest blokowany przez luzindol inhibitor błonowych receptorów melatoninowych.
6. Melatonina zwiększa poziom kolagenu w hodowlach fibroblastów i miofibroblastów z ziarniny ran powierzchniowych. Działanie hormonu jest hamowane przez luzindol inhibitor błonowych receptorów dla melatoniny. Obniżenie poziomu kolagenu w ranach powierzchniowych nie może być wyjaśnione bezpośrednim działaniem melatoniny na komórki rany syntetyzujące macierz pozakomórkową.

7. Melatonina w dawkach fizjologicznych podwyższa poziom glikozoaminoglikanów w mięśniu lewej komory nie objętym niedokrwieniem. Efekt ten może być wyjaśniony bezpośrednim wpływem hormonu na fibroblasty mięśnia lewej komory. Działanie melatoniny jest hamowane przez luzindol.

Znaczenie pracy: Regulacja syntezy kolagenu w bliźnie pozawałowej budzi coraz większe zainteresowanie na świecie. Kolagen jest białkiem nie tylko determinującym właściwości mechaniczne blizny, ale może również wywierać regulacyjny wpływ na procesy gojenia. Odpowiednia wytrzymałość mechaniczna blizny pozawałowej jest krytycznym czynnikiem ograniczającym niektóre powikłania zawału takie jak ekspansja zawału, pęknięcie blizny lub tworzenie się tętniaków pozawałowych. Wymienione powikłania mogą nasilać niewydolność krążenia i znacząco pogarszać jakość życia pacjenta, a nawet prowadzić do zgonu. Zatem poznanie mechanizmów kontrolujących poziom kolagenu w bliźnie umożliwi stworzenie podstaw postępowania ograniczającego wymienione powikłania zawału. Wyniki moich badań pozwalają również na sformułowanie hipotezy sugerującej, że zaburzenie sekrecji melatoniny może zmieniać poziom białka kolagenowego w bliźnie pozawałowej. Wiele leków ( $\beta$ -blokery, niesteroidowe leki przeciwzapalne, steroidy, leki przeciwdepresyjne, blokery kanałów wapniowych, benzodiazepiny, leki blokujące receptory  $\alpha$ -adrenergiczne) może hamować sekrecję melatoniny do krwi. Nasze prace wskazują na konieczność wyjaśnienia problemu czy u ludzi podczas wymienionych terapii farmakologicznych dochodzi do zmian poziomu macierzy pozakomórkowej w bliźnie pozawałowej i czy zmiany te wpływają na stan kliniczny pacjenta. Postawiliśmy również hipotezę, że podanie melatoniny pacjentom z zawałem serca może zwiększyć gromadzenie się kolagenu w bliźnie pozawałowej i poprawiać stan kliniczny pacjenta. Weryfikacja hipotezy wymaga badań klinicznych.

### **3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).**

#### **Badania obejmujące doktorat i okres przed doktoratem.**

**Wpływ kromoglikanu sodowego – stabilizatora komórek tucznych na gojenie ran i poziom kolagenu.** Doświadczenia wykonałem przed doktoratem, w latach 1987-1989, pracując w ramach Studenckiego Koła Naukowego przy Zakładzie Patofizjologii pod kierunkiem pana prof. dr hab. R. Dąbrowskiego. Wcześniejsze badania prowadzone przez

pana prof. Dąbrowskiego dowiodły, że histamina przyspiesza gojenie, zwiększa wytrzymałość mechaniczną ran oraz zwiększa poziom kolagenu w ziarninie ran. Regulacja poziomu kolagenu przez histaminę jest zależna od pobudzenia receptorów H1 i H2. Celem pracy było sprawdzenie czy farmakologiczna stabilizacja komórek tucznych, głównego źródła histaminy może wywierać wpływ na procesy gojenia. Szczurom wstrzykiwano kromoglikan sodowy w celu zahamowania degranulacji komórek tucznych. Wyniki eksperymentów pokazały, że podanie kromoglikanu sodowego opóźnia gojenie ran skórnych, zwiększając ich powierzchnię zwłaszcza od 3 do 14 dnia gojenia. Ponadto stosowany stabilizator komórek tucznych obniżał zawartość kolagenu w ziarninie ran. Różnice były szczególnie istotne w 10 i 14 dniu gojenia. Doświadczenia pokazały, że mediatory z komórek tucznych uczestniczą w regulacji procesów gojenia i zawartości kolagenu w ziarninie ran. Praca otrzymała I nagrodę na XXVI Konferencji Uczelnianej Studenckich Kół Naukowych w 1988r oraz III nagrodę w sekcji prac teoretycznych na XXVI Ogólnopolskiej Konferencji Kół Naukowych – Symposium Medicum 89 w Katowicach w 1989r. Doniesienie to było również prezentowane na VI Międzynarodowym Kongresie Studentów Medycyny w Istambule w 1990r.

Prace dotyczące regulacyjnego wpływu histaminy na procesy kolagenogenezy są aktualnie prowadzone na hodowlach miofibroblastów pobranych z blizn pozawałowych i fibroblastów z ziarniny ran powierzchniowych. Wykazałem, że histamina zwiększa poziom kolagenu w hodowlach miofibroblastów pobranych z blizny pozawałowej, a proces ten jest zależny od aktywacji receptorów H3. Udowodniłem jednocześnie obecność receptorów H3 na badanych miofibroblastach. Wstępne wyniki zostały wygłoszone w formie dwóch komunikatów.

**Badanie wpływu melatoniny na zawartość białka kolagenowego w ranach powierzchniowych:** Cunnane i współpracownicy (1979) zaobserwowali nadmierne włóknienie w przestrzeni pozaotrzewnowej u pinealektomizowanych szczurów i wysunęli hipotezę, że zwiększone włóknienie wynika z obniżonego poziomu melatoniny u badanych zwierząt. Celem moich prac było sprawdzenie czy melatonina może wywierać regulacyjny wpływ na zawartość kolagenu w modelu ran powierzchniowych. W pracy tej (Drobnik, 1992) wykazałem, że wstrzykiwanie melatoniny w godzinach wieczornych obniża poziom kolagenu w ziarninie ran. U zwierząt poddanych chirurgicznej pinealektomii obserwowałem podwyższony poziom kolagenu w badanym modelu rany. Natomiast stosowanie melatoniny (dawka 30  $\mu\text{g}/100\text{ g m.c.}$ ) u pinealektomizowanych szczurów znosiło efekt pinealektomii i normalizowało poziom kolagenu w ranach. Dawka ta wywierała efekt równoważny

działaniu endogennej melatoniny. Ponadto u szczurów pinealektomizowanych stwierdzono statystycznie istotny wzrost poziomu chondroityno-4-siarczanu w ranach. U zwierząt traktowanych melatoniną zauważono tendencję do obniżenia poziomu chondroityno-4-siarczanu (Drobnik 1992). Stwierdziłem również opóźnienie gojenia powierzchniowych ran skórnych u zwierząt traktowanych melatoniną. Spowolnienie gojenia ran widoczne było zwłaszcza między 7 i 14 dniem gojenia. Natomiast u szczurów pinealektomizowanych zaobserwowałem przyspieszone gojenie ran. U zwierząt, które przebywały w ciągłej ciemności stwierdzono upośledzony przebieg gojenia ran powierzchniowych oraz obniżoną zawartość białka kolagenowego w ziarninie ran. Ponadto, u zwierząt tych stwierdzono również obniżenie poziomu siarczanu dermatanu i 6-siarczanu chondroityny. Zmiany obserwowane u zwierząt hodowanych w warunkach ciągłej ciemności wiąże się z podwyższonym międzyszczytowym poziomem melatoniny. Przedstawione wyniki zostały wykorzystane w rozprawie doktorskiej wykonanej pod kierunkiem pana prof. dr hab. R. Dąbrowskiego.

#### **Prace prowadzone po doktoracie.**

**Badanie wpływu melatoniny na zawartość białka kolagenowego (kontynuacja).** Efekt melatoniny jest zależny od pory podania hormonu (Drobnik i wsp., 2000). Podanie melatoniny w godzinach porannych podwyższa zawartość kolagenu w ranach natomiast wieczorna aplikacja hormonu obniża poziom tego białka w ziarninie ran. W kolejnej pracy (Drobnik i wsp., 1999) udowodniłem, że melatonina również obniża poziom kolagenu w nieuszkodzonej skórze u szczurów.

Zagadnienie regulacyjnego wpływu melatoniny na gojenie ran i akumulację w nich macierzy pozakomórkowej było tematem dwóch prac przeglądowych opublikowanych w *Journal of Experimental and Integrative Medicine* (2012) oraz w *Current Topics in Pharmacology* (2008). Pierwsza z prac (Drobnik, 2012) została napisana na zaproszenie redakcji i opublikowana w dziale: *Invited Review*.

**Wpływ nadciśnienia lub hipercholesterolemii na gromadzenie się kolagenu i glikozoaminoglikanów w aorcie piersiowej i brzusznej u królików:** Praca ta była podstawą ekspertyzy, której byłem kierownikiem, otrzymanej z Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej (okres realizacji 1999). Wcześniejsze hipotezy zakładały jednakową odpowiedź tkanki łącznej na działanie różnych bodźców powodujących uszkodzenie tkanek.

Natomiast obserwacje rozwoju zmian miażdżycowych w aorcie wykazały, że wczesne zmiany miażdżycowe powstają głównie w aorcie piersiowej (progression resistant location). Ulegają one bardzo powolnej progresji do blaszek dojrzałych. W aorcie brzusznej zmiany wczesne powstają stosunkowo późno, ale ulegają szybkiej progresji do zmian dojrzałych składających się lipidowego jądra i łącznotkankowej otoczki. Celem pracy (Drobnik i wsp., 2000) było wyjaśnienie hipotezy zakładającej różną wrażliwość aorty piersiowej i aorty brzusznej na uszkodzenia i odmienny przebieg procesu gojenia w badanych segmentach aorty. Ponadto planowaliśmy wyjaśnić czy różne bodźce aterogenne (nadciśnienie lub hipercholesterolemia) mogą wywoływać podobną odpowiedź naprawczą w aorcie piersiowej lub brzusznej. Badania przeprowadziliśmy na królikach. Hipercholesterolemia została wywołana poprzez stosowanie diety z dodatkiem 0,25% cholesterolu. W grupie tej wykazaliśmy znaczący wzrost cholesterolu całkowitego w surowicy krwi. Nadciśnienie tętnicze indukowane poprzez wstrzykiwanie dożylnie wazopresyny utrzymywało się do końca trwania doświadczenia. Wzrost poziomu glikozoaminoglikanów całkowitych i siarczanu heparanu oraz brak zmian poziomu kolagenu stwierdzono w wewnętrznej części aorty piersiowej w obydwu badanych grupach (z nadciśnieniem lub hipercholesterolemią). U zwierząt z nadciśnieniem opisane zmiany obejmowały również zewnętrzną część aorty piersiowej. Dodatkowo w grupie tej opisywaliśmy wzrost poziomu chondroityno-4-siarczanu. W części brzusznej aorty stwierdzono wzrost poziomu kolagenu bez zmian zawartości glikozoaminoglikanów. Doświadczenia te pokazały, że badane bodźce aterogenne (nadciśnienie i hipercholesterolemia) wywołują podobną odpowiedź łącznotkankową w odpowiednich częściach aorty. Odpowiedź na uszkodzenie jest natomiast różna w obydwu badanych segmentach aorty (brzusznym i piersiowym). Praca pokazuje, że czynniki miejscowe (zależnych od lokalizacji anatomicznej) mogą decydować o odpowiedzi tkanki łącznej na uszkodzenie. Ponieważ w obydwu badanych grupach w aorcie piersiowej stwierdzono wzrost poziomu siarczanu heparanu, postawiłem hipotezę, że ten glikozoaminoglikan może być odpowiedzialny za hamowanie syntezy kolagenu w aorcie piersiowej, a jednocześnie może zmniejszać progresję blaszki miażdżycowej. Hipoteza ta jest również oparta na danych literaturowych opisujących hamowanie przez siarczan heparanu ekspresji genów kolagenu oraz proliferacji komórek. Praca ta ma znaczenie dla zrozumienia procesu tworzenia się blaszki miażdżycowej w różnych częściach aorty. W 1995 r otrzymałem stypendium Fundacji Batorego celem prezentacji opisanych powyżej badań na Pierwszym Kongresie Federacji Europejskich Towarzystw Fizjologicznych w Maastricht ( 9 - 12 września, 1995).

**Zmiany poziomu glikozoaminoglikanów w sercu po zawale:** W ziarninie ran powierzchniowych stwierdza się wzrost poziomu glikozoaminoglikanów w początkowym okresie gojenia, a następnie obserwuje się obniżenie ich zawartości. Celem pracy (Drobnik i wsp., 2004) było sprawdzenie czy w sercu po zawale obserwuje się zmiany poziomu glikozoaminoglikanów. Eksperymenty pokazały wzrost zawartości glikozoaminoglikanów w bliźnie pozawałowej w 6 tygodniu po zawale, a następnie obserwowano znaczący spadek poziomu tych związków w 12 tygodniu gojenia. W mięśni lewej komory nie objętym niedokrwieniem stwierdzono znaczący wzrost poziomu glikozoaminoglikanów w 3 i 6 tygodniu po zawale, a następnie normalizację zawartości glikozoaminoglikanów do poziomu stwierdzanego w grupie kontrolnej. W mięśniach prawej komory i przegrody stwierdzono wzrost zawartości glikozoaminoglikanów w 6 tygodniu po zawale, a następnie normalizację poziomu tych związków w 12 tygodniu. W skórze zwierząt z zawałem serca nie stwierdzono zmian poziomu glikozoaminoglikanów. Fakt ten może wskazywać, że mechanizm zjawiska jest zależny od czynników lokalnych w sercu i nie obejmuje zmian regulacji ogólnoustrojowej. Znaczenie zjawiska nie jest znane. Należy jednak podkreślić, że glikozoaminoglikany są odpowiedzialne za regulację gospodarki wodno-elektrolitowej w tkankach oraz mogą wpływać na działanie czynników wzrostu. Zjawisko to może mieć, zatem znaczenie w generowaniu zaburzeń rytmu serca lub powstaniu przerostu mięśnia sercowego.

**Wpływ niedoczynności tarczycy na zawartość macierzy pozakomórkowej w sercu:** Praca (Drobnik i wsp., 2009) wykonana była pod kierunkiem pana prof. dr hab. R. Dąbrowskiego. Eksperymenty zrobiono w ramach pracy własnej (502-12-614) przyznanej przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi. Pełniłem funkcję kierownika tego grantu. Część pracy stanowiła fragment rozprawy doktorskiej dr n. med. A. Marczyńskiego. W związku ze stosunkowo dużą częstością występowania niedoczynności tarczycy u pacjentów w wieku podeszłym postanowiliśmy zbadać wpływ tego zaburzenia na gromadzenie macierzy łącznotkankowej w sercu. Nadmierne gromadzenie macierzy pozakomórkowej w sercu może zmniejszać podatność ścian serca i sprzyjać rozwojowi niewydolności krążenia. Badanie wpływu niedoczynności tarczycy na poziom macierzy pozakomórkowej w sercu przeprowadzono u szczurów z eksperymentalnie indukowaną niedoczynnością tarczycy, którą wywołano poprzez podawanie metylotiouracylu lub tyreoidektomię. W obydwu badanych grupach niedoczynność tarczycy potwierdzono poprzez wykazanie obniżonego poziomu hormonów tarczowych (T3 i T4) oraz wysokiego stężenia TSH. U zwierząt z niedoczynnością

tarczycy zaobserwowano wysoką zawartość kolagenu i glikozoaminoglikanów w mięśniu sercowym. W dalszej części pracy postawiłem hipotezę sugerującą, że zmiany poziomu tkanki łącznej mogą być spowodowane działaniem TSH. W kolejnych eksperymentach wyizolowano, z mięśnia sercowego szczurów, fibroblasty i sprawdzono wpływ TSH na liczbę komórek w hodowli oraz poziom kolagenu i glikozoaminoglikanów. TSH (2 i 20 mU/ml) zwiększały liczbę komórek w hodowli natomiast nie wpływały na zawartość kolagenu i glikozoaminoglikanów. Przeprowadzone eksperymenty wykazały wzrost macierzy pozakomórkowej w sercu u zwierząt z niedoczynnością tarczycy, efekt ten nie wynikał z bezpośredniego działania TSH na fibroblasty serca. Zagadnienia wpływu niedoczynności tarczycy na strukturę i czynność układu krążenia zebrałem w pracy poglądowej opublikowanej w książce Hypothyroidism – Influences and Treatment pod redakcją dr D. Springer.

**Wpływ dibutyrylochityny na procesy gojenia ran:** Korzystny wpływ chityny na proces gojenia ran został udowodniony w wielu pracach. Wprowadzenie do makrocząsteczek chityny objętościowo dużych grup butyrylowych pozwoliło uzyskać jej estrową pochodną o stopniu podstawienia bliskim 2 - dibutyrylochitynę. Jest to polimer przyjazny technologicznie, a opatrunki z dibutyrylochityny nie tylko chronią rany przed wpływem środowiska zewnętrznego, ale również mogą przyspieszać ich gojenie. Materiał włókienniczy wykonany z dibutyrylochityny jest biogodny i całkowicie resorbowalny przez organizm. Spełnia wszystkie wymagania biologiczne stawiane wyrobom medycznym zawartym w normie europejskiej PZPN-EN ISO 10993. Celem pracy (Błasińska i Drobnik, 2008) było wyjaśnienie mechanizmów działania dibutyrylochityny w procesie gojenia ran. Znajomość mechanizmów działania dibutyrylochityny pozwoli na klarowne określenie wskazań i przeciwwskazań dla stosowania tego polimeru u pacjentów oraz ocenić ewentualne ryzyko, jakie może się pojawić wraz z jego zastosowaniem. W pierwszej części doświadczenia badaliśmy wpływ dibutyrylochityny na procesy gojenia oraz porównywaliśmy efekty dibutyrylochityny z działaniem butyrylochityny (zawierającej 50% grup butyrylowych, stopień podstawienia 1), regenerowanej chityny nie zawierającej grup butyrylowych (stopień podstawienia 0) oraz chitozanu. Dibutyrylochityna znacząco zwiększała masę powstającej ziarniny oraz zawartość glikozoaminoglikanów w ranie. Poziom kolagenu całkowitego nie zmieniał się, ale dibutyrylochityna obniżała zawartość niespolimeryzowanego kolagenu rozpuszczalnego. Zjawisko to należy łączyć z lepszą opornością blizny na zrywanie. Ponadto wykazaliśmy, że fibroblasty wyizolowane z ziarniny ran, przyczepiały się do błony



z dibutyrylochityny i mogły być w takich warunkach hodowane. Liczba komórek rosnących na błonie była znacząco większa w porównaniu z kontrolą. Ponadto dibutyrylochityna zmniejszała liczbę komórek martwych. Powyższe wyniki pokazały, że dibutyrylochityna jest materiałem pobudzającym procesy gojenia, zwiększającym zawartość istoty międzykomórkowej w ziarninie oraz poprawiającym jakość macierzy pozakomórkowej. Hydroliza dibutyrylochityny do butyrylochityny lub chityny regenerowanej nie poprawiała efektów biologicznych polimeru. Zaobserwowaliśmy również, że mechanizm działania dibutyrylochityny różnił się od mechanizmu działania chitozanu, który w przeciwieństwie do dibutyrylochityny obniżał poziom glikozoaminoglikanów w ziarninie ran. W oparciu o przedstawione wyniki stwierdziliśmy, że dibutyrylochityna jest nie tylko dobrym materiałem opatrunkowym, ale może być również stosowana, jako podłoże (scaffold) do hodowli tkanek.

W kolejnym projekcie dotyczącym badań nad biologicznymi efektami dibutyrylochityny zastosowaliśmy materiały wykonane z włókien o wymiarze poprzecznym od 800 nanometrów do 3  $\mu\text{m}$ . Do wytworzenia włókien polimeru posłużyła technika przędzenia w polu elektrostatycznym (electrospinning). Przy użyciu pola elektrostatycznego, bezpośrednio z polimeru wytworzone zostały włókna i równocześnie z nimi materiał włókninowy. Uzyskany materiał drobnowłóknisty swoją budową wykazuje podobieństwo do naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej. Do zalet scaffoldów otrzymanych przy zastosowaniu elektrospinningu zaliczyć można silnie rozwiniętą powierzchnię i porowatość materiału. Dodatkowo, kompozycja scaffoldu i jego wytwarzanie mogą być kontrolowane, tak by był on jak najbardziej zbliżony konstrukcyjnie i morfologicznie do struktur występujących w organizmach żywych. Ze względu na zmianę wymiaru poprzecznego włókien nie jest znany ich wpływ na organizm żywy. Może być on zupełnie różny od materiałów wykonanych z grubych włókien dibutyrylochityny i testowanych do chwili obecnej. Celem pracy (Drobnik i wsp., wysłana do druku) było zbadanie wpływu drobnowłóknistych implantów z dibutyrylochityny na procesy gojenia ran oraz porównanie biologicznych efektów tego polimeru z drobnowłóknistym polikaprolaktonem. Przeprowadzone badania sugerują korzystny wpływ drobnowłóknistej dibutyrylochityny na procesy reparacji. Ponadto pokazują, że jest ona materiałem stosunkowo bezpiecznym (bez efektu hepatotoksycznego i nefrotoksycznego). Drobnowłóknista dibutyrylochityna korzystnie wpływała na uwodnienie rany, zwiększała masę ziarniny w ranie oraz nie zaburzała procesu reparacji. Stosowanie dibutyrylochityny i polikaprolaktonu nie wywołało nadmiernego włóknienia, dlatego też polimery te mogą być zastosowane, jako materiały opatrunkowe lub scaffolds do hodowli

komórek służących do uzupełniania ubytków tkanek. Dibutyrylochityna w przeciwieństwie do polikaprolaktonu nie zaburzała metabolizmu glikozoaminoglikanów w ranie podczas gojenia. Stosowanie dibutyrylochityny jako domieszki pokrywającej implanty może dać korzystne efekty. Odczyn zapalny wywołany przez implantację dibutyrylochityny jest identyczny jak w przypadku polikaprolaktonu i jest typowy dla materiałów bioresorbowalnych.

Badania dibutyrylochityny były efektem dwóch grantów pt: „Biomedical textiles from dibutyrylchitin and chitin” - Chitomed (QLK5-CT-200201330, Piąty Program Ramowy) oraz „Biodegradowalne Włókny dla Zastosowania w Medycynie Rolnictwie i Technice. Zadanie 4a i 4b. Charakterystyka właściwości biologicznych, hemostatycznych materiałów opatrunkowych wytwarzanych z dibutyrylochityny, nanowłóknistych elementów kompozytu implantacyjnego oraz warstw nanowłókien do podłoża do hodowli komórkowych” (PBZ-MNiSW-01/II/2007). W pierwszym projekcie byłem podwykonawcą natomiast w drugim wykonawcą. W obydwu projektach byłem odpowiedzialny za zaplanowanie i wykonanie badań biomedycznych. Kierownikiem grantów była pani prof. dr hab. inż. I. Krucińska.

**Badanie mechanizmów uwalniania wazopresyny i oksytocyny:** Zagadnienie to obejmuje trzy opublikowane prace wykonane we współpracy i pod kierunkiem pani prof. nadzw. dr hab. med. J. Ciosek.

Wpływ melatoniny na uwalnianie wazopresyny i oksytocyny w warunkach zawału serca: Wydzielanie wazopresyny i oksytocyny jest częścią odpowiedzi neuroendokrynej stwierdzanej w warunkach niewydolności krążenia wywołanej zawałem serca. Celem pracy (Ciosek i Drobnik, 2012) było sprawdzenie czy sekrecja tych neurohormonów może być modyfikowana przez melatoninę w warunkach zawału serca. W doświadczeniu stwierdziliśmy podwyższony poziom wazopresyny i oksytocyny w osoczu krwi zwierząt z zawałem serca. Wydzielanie obydwu neurohormonów było hamowane przez melatoninę. Natomiast pinealektomia powodowała zwiększone wydzielanie oksytocyny i hamowanie sekrecji wazopresyny. Stosowanie melatoniny u pinealektomizowanych zwierząt hamowało wydzielanie oksytocyny i nasilało sekrecję wazopresyny. Doświadczenia te pokazały regulacyjny wpływ melatoniny na sekrecję wazopresyny i oksytocyny w warunkach indukowanej zawałem serca niewydolności krążenia.

Badanie roli galaniny w regulacji sekrecji oksytocyny: Celem pracy (Ciosek i Drobnik, 2013) było sprawdzenie czy galanina może być czynnikiem regulującym uwalnianie oksytocyny z układu podwórzowo-przysadkowego, podwzgórza lub części nerwowej przysadki w warunkach *in vitro*. Doświadczenia przeprowadziliśmy na izolowanym

układzie podwzgórzowo-przysadkowym stymulowanym dodatkowo bodźcem osmotycznym. Wyniki eksperymentów wykazały, że galanina hamuje uwalnianie oksytocyny z części nerwowej przysadki, a pobudza uwalnianie tego hormonu z podwzgórza. Regulacyjne działanie galaniny widoczne jest tylko w warunkach działania przewlekłego pobudzenia osmotycznego. Natomiast ostre pobudzenie osmotyczne blokuje wrażliwość neuronów oksytocynnergicznych na działanie galaniny.

Badanie wpływu nadczynności i niedoczynności tarczycy na wydzielanie oksytocyny i wazopresyny: Wyniki otrzymane w pracy (Ciosek i Drobniak, 2004) pokazały, że zaburzenia czynności tarczycy powodują zmiany sekrecji obydwu neurohormonów w stanie równowagi wodno-elektrolitowej. Ponadto w stanie niedoczynności lub nadczynności tarczycy stwierdzono zmienioną odpowiedź neuronów wazopresynergicznych i oksytocynnergicznych na bodźce osmotyczne.

**Wpływ zawału serca na ekspresję receptorów dla angiotensyny w gruczole krokowym u szczura:** Praca przeprowadzona była we współpracy z panią dr A.W. Piastowską-Ciesielską. Zmiany ekspresji receptorów dla angiotensyny w układzie krążenia po zawale serca zostały opisane wcześniej. Natomiast wpływ zawału serca na poziom receptorów dla angiotensyny w innych narządach nie są poznane. Celem pracy (Piastowska-Ciesielska i wsp., 2011) było opisanie ekspresji receptorów dla angiotensyny w gruczole krokowym u szczurów po zawale serca. W pracy wykazaliśmy wzrost poziomu mRNA i białka receptorowego typu AT1 dla angiotensyny.

#### **Stypendia naukowe:**

**Wpływ szyszynki na efekty wazopresyny w procesach uczenia się u szczurów:** Pracę wykonałem pod kierunkiem pana prof. H. Schwarzberga w Zakładzie Neurofizjologii Uniwersytetu im. Otto von Guericke w Magdeburgu. Jest ona efektem dwukrotnego stypendium naukowego uzyskanego w latach 1990 i 1993. Celem pracy (Juszczak i wsp., 1996) było zbadanie czy szyszynka może modyfikować działanie wazopresyny poprawiającej procesy uczenia się i zapamiętywania u szczurów. W eksperymentach wykorzystaliśmy model biernego unikania elektrycznego bodźca. Podanie wazopresyny w grupie kontrolnej poprawiało efekt uczenia się szczurów, natomiast działanie to nie występowało u zwierząt pinealektomizowanych. Pozytywny efekt wazopresyny był również blokowany przez melatoninę podawaną szczurom z operacją pozorowaną. Natomiast melatonina podawana

szczurom pinealektomizowanym nie wpływała na działanie wazopresyny. Zatem efekt wazopresyny jest modyfikowany przez szyszynkę i jej hormon melatoninę.

**Pobyt w Zakładzie Fizjologii, Uniwersytetu Medycznego w Kagawie** (Japonia) poświęcony był badaniom mechanizmu nadciśnienia u szczurów Dahla wrażliwych na chlorek sodowy DS (Dahl salt sensitive rats). U zwierząt tych dieta zawierająca nadmiar chlorku sodowego powodowała rozwój nadciśnienia tętniczego. Kontrolą dla grupy badanej (DS.) były szczury Dahla odporne na chlorek sodowy DR (Dahl salt resistant rats). W naszych badaniach założyliśmy udział endotheliny w mechanizmie powstania nadciśnienia u szczurów DS. Badania przeprowadziliśmy na wyizolowanej tętnicy nerkowej z obydwu rodzajów szczurów. Wykazaliśmy, że zablokowanie receptorów ETA dla endotheliny hamuje odpowiedź skurczową tętnicy nerkowej pobranej z obydwu rodzajów szczurów. Blokowanie receptorów ETB dla endotheliny hamuje obkurczanie się tętnicy nerkowej szczurów DS, natomiast nie wpływa na reakcję tętnicy pobranej od zwierząt DR. Podanie agonisty receptorów B dla endotheliny powodowało obkurczanie się tętnicy nerkowej zwierząt DS. Tętnica nerkowa szczurów DR nie reagowała na obecność agonistów ETB. W oparciu o przeprowadzone badania stwierdziliśmy odmienny mechanizm działania endotheliny u obydwu badanych grup zwierząt. U zwierząt DS obkurczanie tętnicy nerkowej jest zależne od receptorów ETA i ETB natomiast u szczurów DR odpowiedź skurczowa badanej tętnicy jest wynikiem aktywacji receptora ETA. Badania były efektem stypendium Monbusho, które otrzymałem od rządu Japonii. Eksperymenty były wykonane w latach 1996-1997.

**Pobyt (2000/2001) w Centrum Biofizyki Molekularnej w Orleanie** we Francji oraz praca pod kierunkiem pani prof. C. Kiedy pozwoliły mi zapoznać się z nowoczesnymi technikami badań naukowych obejmującymi metodykę hodowli komórkowych, cytometrię oraz techniki stosowane w biologii molekularnej. W zespole pani prof. C. Kiedy zajmowałem się badaniem ekspresji receptorów dla chemokin na komórkach śródbłonna pobranych z narządów układu limfatycznego. Badałem również wpływ glikozoaminoglikanów na ekspresję receptorów dla cytokin na komórkach śródbłonna. Ponadto otrzymałem zadanie przygotowania metody badania recykulacji limfocytów w warunkach *in vitro*. Znaczną część metod badawczych poznanych podczas pobytu w Orleanie odtworzyłem w Zakładzie Patofizjologii w latach 2003-2005. Utworzyłem wtedy pracownię hodowli komórkowej oraz w latach późniejszych pracownię biologii molekularnej.

Jacek Drabnik 20