

Autoreferat

dr n. med. Aneta Stachowicz

Katedra Farmakologii
Wydział Lekarski
Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Kraków, 2023

1. Imię i nazwisko.

Aneta Stachowicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2011 – 2015

Interdyscyplinarne studia doktoranckie „**Nauki molekularne dla medycyny**” (MOL-MED) prowadzone przez Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN, Wydział Lekarski Collegium Medium, Wydział Chemii UJ i Instytut Farmakologii PAN

Doktor nauk medycznych (biologia medyczna) – październik 2015, nadany przez Radę Wydziału Lekarskiego UJ CM

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Badania nad rolą mitochondrialnej dehydrogenazy aldehydowej (ALDH2) w patogenezie miażdżycy, depresji i neurodegeneracji*” - napisana pod opieką prof. dr hab. Rafała Olszaneckiego i prof. dr hab. Agnieszki Basty-Kaim

2005 – 2010

Studia magisterskie na kierunku **Biofizyka**, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

Magister biofizyki – czerwiec 2010

Tytuł pracy magisterskiej: „*Identyfikacja fosfoproteomu rdzenia kręgowego szczura przy użyciu metody IMAC i TiO₂-MOAC oraz spektrometrii mas*” - napisana pod opieką prof. dr hab. Jerzego Silberringa

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

2015 – obecnie Katedra Farmakologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, początkowo jako pracownik naukowo – techniczny, a od października 2020 roku jako adiunkt badawczy

2019 – 2020 Heart Institute, Cedars-Sinai Medical Center (Los Angeles, USA) jako badacz wizytujący typu post-doc

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Moje osiągnięcie naukowe stanowi cykl 3 prac pod tytułem:

„Zastosowanie metod proteomicznych do poszukiwania molekularnych mechanizmów wpływających na fenotypowe różnicowanie komórek w chorobach układu krążenia o podłożu zapalnym”

W skład powyższego osiągnięcia naukowego wchodzi cykl oryginalnych prac naukowych o sumarycznym Impact Factor 18.808 (na podstawie Web of Science Core Collection i Journal Citation Reports z dnia 19.09.2023 r.):

- 1. Stachowicz Aneta, Wiśniewska Anna, Kuś Katarzyna, Białas Magdalena, Łomnicka Magdalena, Totoń-Żurańska Justyna, Kiepusza Anna, Stachyra Kamila, Suski Maciej, Bujak-Giżycka Beata, Jawień Jacek, Olszanecki Rafał. *Diminazene Aceturate Stabilizes Atherosclerotic Plaque and Attenuates Hepatic Steatosis in apoE-Knockout Mice by Influencing Macrophages Polarization and Taurine***

Biosynthesis. **International Journal of Molecular Sciences** 2021: Vol. 22, nr 11, id. art. 5861. **IF:** 6.208, **MEiN:** 140.000, Kwartyl: Q1 (76,94).

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu oznaczeń proteomicznych, biochemicznych, Western blot oraz doświadczeń *in vitro* w hodowli komórkowej. Ponadto uczestniczyłam w opracowaniu i interpretacji wyników, przeprowadziłam analizę statystyczną oraz przygotowałam manuskrypt wraz z rycinami.

- 2. Stachowicz Aneta**, Pandey Rakhi, Sundararaman Niveda, Venkatraman Vidya, Van Eyk Jennifer E., Fert-Bober Justyna. *Protein arginine deiminase 2 (PAD2) modulates the polarization of THP-1 macrophages to the anti-inflammatory M2 phenotype*. **Journal of Inflammation** 2022: Vol. 19, id. art. 20. **IF:** 5.100, **MEiN:** 100.000, Kwartyl: **Q2 (59,9)**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji, zaprojektowaniu badania, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu doświadczeń *in vitro* w hodowli komórkowej, oznaczeń proteomicznych oraz biologii molekularnej (siRNA, RT-qPCR, Seahorse, ELISA). Ponadto opracowałam i zinterpretowałam wyniki, przeprowadziłam analizę statystyczną oraz przygotowałam manuskrypt wraz z rycinami.

- 3. Stachowicz Aneta**, Sadiq Alia, Walker Brian, Sundararaman Niveda, Fert-Bober Justyna. *Treatment of human cardiac fibroblasts with the protein arginine deiminase inhibitor BB-CI-amidine activates the Nrf2/HO-1 signaling pathway*. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 2023: Volume 167, 115443. **IF:** 7.500, **MEiN:** 100.000, Kwartyl: **Q1 (91,9)**.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu doświadczeń *in vitro* w hodowli komórkowej, oznaczeń proteomicznych oraz biologii molekularnej (RT-qPCR). Ponadto opracowałam i zinterpretowałam wyniki, przeprowadziłam analizę statystyczną oraz przygotowałam manuskrypt wraz z rycinami.

Wprowadzenie

Choroby układu krążenia o podłożu zapalnym, takie jak miażdżycy i niewydolność serca są obecnie ogólnoswiatowym problemem zdrowotnym i jedną z częstych przyczyn śmierci w krajach zachodnich ¹. Miażdżycy jest przewlekłą chorobą zapalną dotykającą ściany tętnic, z istotną patogenetyczną rolą uszkodzenia śródbłonka i zaburzeń gospodarki lipidowej. Uważa się, że pierwszym etapem rozwoju miażdżycy jest dysfunkcja śródbłonka polegająca na zmianie jego fenotypu na „zapalny”, co sprzyja „prześlakaniu” do przestrzeni podśródbłonkowej utlenionych LDL (ox-LDL) oraz komórek zapalnych: monocytów i limfocytów. Napływające monocyty różnicują do makrofagów, które wychwytyują ox-LDL i zmieniają się w komórki piankowe, które wydzielają liczne cytokiny odpowiedzialne za nasilenia zmian zapalnych w ścianie naczynia ². Dochodzi również do aktywacji i proliferacji mięśni gładkich oraz fibroblastów i wykształcenia dojrzałych blaszek miażdżycowych, z nekrotycznym rdzeniem i włóknistą pokrywą. Blaszkami miażdżycowymi mogą zarówno zwęzać światło naczynia, jak i ulegać groźnym pęknięciom, co prowadzi do zakrzepicy i może skutkować niestabilną dławicą, zawałem serca lub udarem niedokrwiennym mózgu ³. Niewydolność serca to postępująca choroba przewlekła i najczęstszy końcowy objaw większości chorób sercowo-naczyniowych. Charakteryzuje się przerostem i zwłóknieniem mięśnia sercowego, co prowadzi do zmniejszenia kurczliwości mięśnia sercowego i niemożności pompowania odpowiedniej ilości krwi do narządów. Zwłóknienie serca powstaje w wyniku nagromadzenia się białek macierzy zewnątrzkomórkowej w śródmiąższu serca i przyczynia się do dysfunkcji zarówno skurczowej, jak i rozkurczowej ⁴.

Zarówno w rozwoju miażdżycy, jak i niewydolności serca dochodzi do niekorzystnego fenotypowego różnicowania komórek ^{5,6}. Kluczową rolę w patogenezie miażdżycy odgrywają komórki układu odpornościowego - makrofagi, których aktywacja do prozapalnego fenotypu zaangażowana jest w rozwój niestabilnych blaszek miażdżycowych. Makrofagi wykazują dużą plastyczność w odpowiedzi na bodźce mikrośrodowiskowe, takie jak czynniki wzrostu, cytokiny i chemokiny, co prowadzi do ich polaryzacji do różnych fenotypów. W blaszkach miażdżycowych można wyróżnić dwa główne fenotypy makrofagów: makrofagi prozapalne M1 (aktywowane klasycznie) i makrofagi przeciwzapalne M2 (aktywowane alternatywnie). Makrofagi M1, które są wytwarzane w odpowiedzi na lipopolisacharyd (LPS) i interferon gamma (IFN- γ), produkują tlenek azotu (NO) i cytokiny prozapalne (interleukina 1 β (IL-1 β)), czynnik

martwicy nowotworów (TNF- α), białko chemotaktyczne monocytów (MCP-1)) oraz są odpowiedzialne za usuwanie patogenów. Natomiast makrofagi M2, które są generowane w odpowiedzi na IL-4 i IL-13, uwalniają przeciwzapalną IL-10, fibronektynę, transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β) oraz są zaangażowane w usuwanie stanu zapalnego oraz gojenie i naprawę tkanek^{7,8}. Ostatnie badania pokazały, że fenotyp makrofagów M1 jest związany z progresją miażdżycy⁹, a polaryzacja makrofagów do fenotypu M2 za pomocą IL-13 może zmniejszać progresję choroby¹⁰. Warto podkreślić, że przeprogramowanie fenotypu makrofagów z prozapalnych M1 na przeciwzapalne M2 może stanowić nowe podejście terapeutyczne w leczeniu chorób układu krążenia o podłożu zapalnym¹¹.

Badania ostatnich lat pokazują, że ważną rolę w patogenezie niewydolności serca, która charakteryzuje się zwłóknieniem serca, odgrywa różnicowanie fibroblastów serca do miofibroblastów⁶. Liczba fibroblastów w zdrowym sercu jest niska, jednak pod wpływem czynników stresowych, takich jak uszkodzenie lub przewlekłe nadciśnienie, dochodzi do aktywacji fibroblastów do miofibroblastów. Miofibroblasty wytwarzają kolagen i inne białka macierzy zewnątrzkomórkowej; cechują się też ekspresją białek kurczliwych, takich jak α -aktyna mięśni gładkich (α -SMA). TGF- β jest silnym induktorem różnicowania fibroblastów do miofibroblastów¹². Manipulowanie aktywnością i liczbą miofibroblastów wydaje się istotne dla hamowania progresji zwłóknienia serca i w konsekwencji dysfunkcji serca. Co ważne, przy opracowywaniu nowych leków hamujących zwłóknienie konieczna jest szczegółowa wiedza na temat różnicowania fibroblastów do miofibroblastów.

Proteomika to dziedzina nauki zajmująca się kompleksową analizą wszystkich białek komórki (proteomu). Metodologiczny postęp w tej dziedzinie związany był z rozwojem spektrometrii mas, która umożliwiła identyfikację i ilościowe oznaczenia tysięcy białek jednocześnie, oferując unikatową możliwość wglądu w niemal kompletny proteom komórki. Zaawansowane metody proteomiczne są jednymi z podstawowych filarów, na których bazuje medycyna przyszłości – medycyna precyzyjna. Zaliczamy do nich techniki oparte o tzw. *data-dependent acquisition* (DDA), obejmujące m.in. oznaczenia półilościowe typu *label-free quantification* (bez znakowania próbki) i *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation* (iTRAQ) (ze znakowaniem próbki) oraz techniki oparte o tzw. *data-independent acquisition* (DIA). W metodzie DIA-MS fragmentowane są wszystkie obecne w próbce peptydy, dzięki zastosowaniu wysokorozdzielczych i szybkich spektrometrów mas, co pozwala na jednoczesne i powtarzalne oznaczenia ilościowe wszystkich peptydów wykrytych w danej próbce, co czyni ją idealną metodą do badań biomedycznych^{13,14}. Badania proteomiczne umożliwiają identyfikację mechanizmów

odpowiedzialnych za rozwój chorób, poszukiwanie nowych biomarkerów molekularnych chorób oraz potencjalnych celów dla nowych terapii.

Celem badań przedstawionych w niniejszym osiągnięciu było poszukiwanie molekularnych mechanizmów wpływających na fenotypowe różnicowanie komórek w chorobach układu krążenia o podłożu zapalnym przy zastosowaniu najnowocześniejszych metod proteomicznych. W szczególności skupiono się na poszukiwaniu molekularnych mechanizmów:

1. Polaryzacji makrofagów do fenotypu prozapalnego M1 i przeciwzapalnego M2 w miażdżycy.
2. Różnicowania fibroblastów serca do miofibroblastów.

W badaniach oprócz nowoczesnych metod proteomicznych, takich jak iTRAQ oraz DIA-MS, wykorzystano również metody biochemiczne, histologiczne, immunohistochemiczne oraz biologii molekularnej (wyciszenie genu za pomocą siRNA, ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR), Western blot).

Opis wyników

W pierwszej pracy z cyklu 3 prac, które stanowią osiągnięcie naukowe, pt. *„Diminazene Aceturate Stabilizes Atherosclerotic Plaque and Attenuates Hepatic Steatosis in apoE-Knockout Mice by Influencing Macrophages Polarization and Taurine Biosynthesis”* opublikowanej w International Journal of Molecular Sciences w 2021 roku pokazaliśmy, że farmakologiczna interwencja przy użyciu diminazenu (DIZE) zmieniła polaryzację makrofagów w kierunku makrofagów przeciwzapalnych M2 w blaszce miażdżycowej u myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (apoE^{-/-})¹⁵. Myszy apoE^{-/-} są powszechnie stosowanym zwierzęcym modelem rozwoju miażdżycy; oprócz miażdżycy rozwijają również w wątrobie zmiany o charakterystyce umiarkowanego niealkoholowego stłuszczenia wątroby. DIZE jest aktywatorem enzymu konwertującego angiotensynę typu 2 (ACE2) wchodzącego w skład układu renina-angiotensyna (RAS). Układ RAS z dwoma głównymi przeciwstawnymi efektorami: niekorzystną angiotensyną II (Ang II) i dobroczynną Ang-(1-7) jest uznawany za główny regulator funkcji układu sercowo-naczyniowego oraz procesów metabolicznych. ACE2 poprzez rozbitcie Ang II tworzy Ang-(1-7) i w ten sposób faworyzuje korzystne działania Ang-(1-7)¹⁶. Rzeczywiście nasze badania pokazały, że podawanie DIZE mimo tego, że nie zmniejszyło miażdżycy u myszy apoE^{-/-} na diecie wysokotłuszczowej, to wpłynęło na zwiększenie stabilności blaszki miażdżycowej. Pod wpływem DIZE zmniejszyła się liczba makrofagów

oraz zwiększyła zawartość mięśni gładkich w blaszce miażdżycowej. Dodatkowo podawanie DIZE wpłynęło na polaryzację makrofagów, zwiększając zawartość przeciwzapalnych makrofagów M2 w blaszce miażdżycowej u myszy apoE^{-/-}. Działanie DIZE związane z wpływem na polaryzację makrofagów zostało również potwierdzone *in vitro*, w hodowli makrofagów uzyskanych z linii komórkowej monocytów THP-1. W badaniach *in vitro* DIZE zwiększyło polaryzację makrofagów zarówno do fenotypu M1, jak i M2, co stanowi ciekawy punkt wyjścia do dalszych badań. Natomiast wyniki *in vivo* z blaszek miażdżycowych wskazują tylko na wzrost polaryzacji makrofagów do fenotypu M2 w wyniku podawania DIZE.

Oprócz stabilizacji blaszki miażdżycowej podawanie DIZE spowodowało również zmniejszenie stłuszczenia wątroby u myszy apoE^{-/-} na diecie wysokotłuszczowej, co związane było ze spadkiem poziomu trójglicerydów w wątrobie, wzrostem cholesterolu HDL w osoczu oraz spadkiem poziomu wątrobowego enzymu aminotransferazy alaninowej (ALT) w osoczu. W celu poszukiwania molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za wpływ DIZE na polaryzację makrofagów oraz zmniejszenie stłuszczenia wątroby wykorzystaliśmy metodę proteomiczną iTRAQ. Metoda iTRAQ razem z chromatografią ciekową połączoną ze spektrometrią mas (LC-MS) wskazała 49 białek o zmienionej ekspresji pod wpływem DIZE w wątrobie. Wśród tych białek najciekawszym wydaje się białko o nazwie dekarboksylaza kwasu cysteinowo-sulfonowego (CSAD), które bierze udział w biosyntezie tauryny przekształcając kwas cysteinowo-sulfonowy w hipotaurynę i CO₂. Zwiększoną ekspresję enzymu CSAD w wątrobie myszy apoE^{-/-} pod wpływem DIZE potwierdzono również metodą Western blot. Co ważne, zaobserwowaliśmy także wzrost poziomu tauryny w wątrobie myszy apoE^{-/-}, co zostało zmierzone za pomocą dedykowanych komercyjnych zestawów biochemicznych. Tauryna jest jednym z najliczniej występujących aminokwasów u ssaków i podstawowym regulatorem procesów biologicznych i fizjologicznych. Wykazano, że tauryna może zapobiegać aterogenezie, jak i łagodzić stłuszczenie wątroby u myszy na diecie wysokotłuszczowej^{17,18}. Co ciekawe, pokazano również, że tauryna może wpływać na fenotyp makrofagów zmieniając ich polaryzację w stronę makrofagów przeciwzapalnych M2 w tkance tłuszczowej¹⁹. Podsumowując, nasze badania pokazały, że wzrost biosyntezy i stężenia tauryny w wątrobie myszy apoE^{-/-} leczonych DIZE może być prawdopodobnie jednym z korzystnych mechanizmów działania DIZE w modulacji polaryzacji makrofagów do fenotypu przeciwzapalnego M2 oraz zmniejszaniu stłuszczenia wątroby.

Kolejnym etapem naszych badań było poszukiwanie molekularnych mechanizmów biorących udział w polaryzacji makrofagów do prozapalnych M1 i przeciwzapalnych M2, co zostało opisane w pracy pt. „*Protein arginine deiminase 2 (PAD2) modulates the polarization of THP-1 macrophages to the anti-inflammatory M2 phenotype*” opublikowanej w Journal of Inflammation w 2022 roku ²⁰. W pracy tej postawiliśmy hipotezę, że rodzina enzymów deiminaz białkowo-argininowych (PADs) bierze udział w różnicowaniu makrofagów do fenotypów M1 i M2. PADs katalizują konwersję dodatnio naładowanych reszt argininy do neutralnie naładowanej cytruliny w reakcji hydrolitycznej zwanej cytrulinacją. Utrata argininy zmienia ładunek netto białek prowadząc do zmiany struktury i funkcji białka, wpływa na interakcje białko-białko oraz na jego proteolizę. Ta nieodwracalna reakcja odgrywa ważną rolę w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych w komórce ²¹. Wyróżniamy pięć izoform PAD: PAD1, PAD2, PAD3, PAD4 i PAD6, które wykazują podobieństwo sekwencji na poziomie 50–70%. Izofomy PAD, zwłaszcza PAD2 i PAD4 są szeroko rozpowszechnione w komórkach zapalnych, takich jak makrofagi i neutrofile, jednak ich ekspresję potwierdzono również w fibroblastach serca, kardiomiocytach i komórkach śródbłonna. Warto zauważyć, że zwiększony poziom PADs stwierdzono w chorobach układu krążenia takich jak miażdżyca, zakrzepica, choroba wieńcowa, zwłóknienie serca i zawał mięśnia sercowego ²².

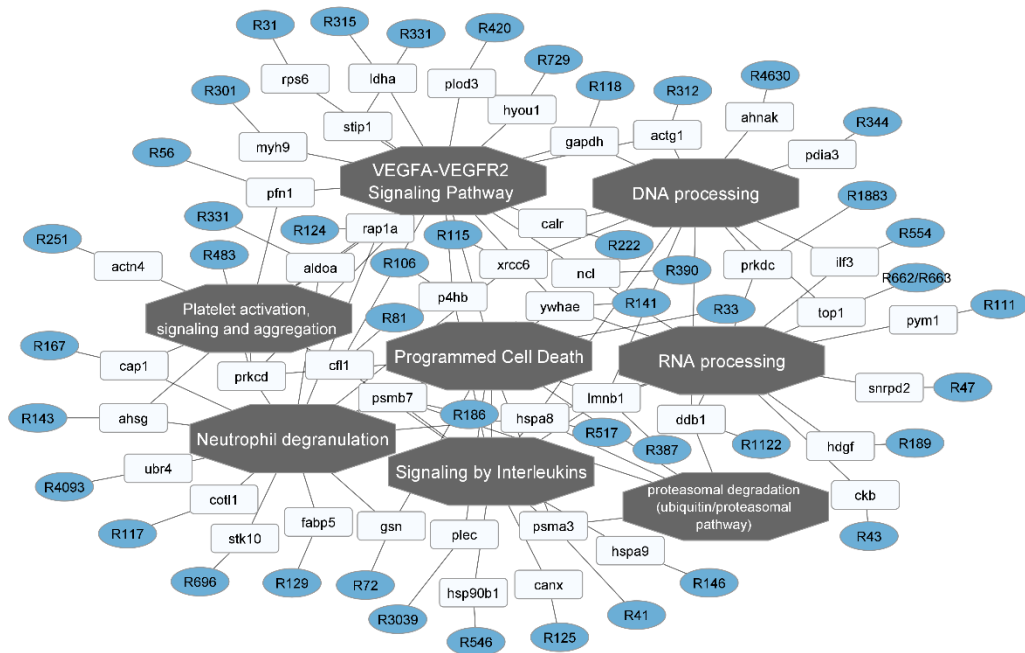
W celu zbadania znaczenia PADs w polaryzacji makrofagów wykorzystaliśmy makrofagi uzyskane z linii komórkowej monocytów THP-1, które następnie zostały zróżnicowane do fenotypu M1 przez stymulację LPS lub do fenotypu M2 poprzez stymulację IL-4. Co ciekawe, zaobserwowano odmienną ekspresję PADs w makrofagach prozapalnych i przeciwzapalnych. Ekspresja mRNA dla PAD1, PAD2 i PAD4 była istotnie podniesiona w makrofagach M1, natomiast ekspresja mRNA dla PAD2 była silnie obniżona w makrofagach M2. Izofomą o największej ekspresji w makrofagach THP-1 był PAD2. Następnie sprawdziliśmy, czy zahamowanie aktywności PADs za pomocą pan-PAD inhibitora BB-CI-amidyny wpłynie na polaryzację makrofagów THP-1. Istotnie, BB-CI-amidyna zmniejszyła polaryzację makrofagów do fenotypu prozapalnego M1 (spadek ekspresji markerów M1: IL-6, TNF- α), a zwiększyła do fenotypu przeciwzapalnego M2 (wzrost ekspresji markerów M2: MRC1 (receptor mannozy typu C1) i ALOX15 (15-lipoksygenaza arachidonianu)), co zostało zmierzone za pomocą metody RT-qPCR. W celu zbadania molekularnych mechanizmów działania inhibitora pan-PAD zastosowano nowoczesne metody proteomiczne: DIA-MS (ang. *data-independent mass spectrometry*). Metoda ta pozwoliła na zidentyfikowanie około 5000 białek w makrofagach THP-1, wśród

których setki białek wykazały zmienioną ekspresję pod wpływem podawania BB-Cl-amidyny w makrofagach M1 i M2. Dane proteomiczne pokazały między innymi, że zahamowanie ekspresji PAD przez BB-Cl-amidynę w prozapalnych makrofagach M1 było związane ze spadkiem ekspresji białek zaangażowanych w aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. NF- κ B odgrywa ważną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej i wytwarzaniu cytokin prozapalnych oraz jest stale aktywny w wielu przewlekłych chorobach zapalnych²³. W związku z tym, zahamowanie polaryzacji makrofagów THP-1 do fenotypu M1 przez pan-PAD inhibitor BB-Cl-amidynę może być związane z wpływem na szlak aktywujący czynnik transkrypcyjny NF- κ B. Można zatem wysunąć hipotezę, że BB-Cl-amidyna posiada potencjał jako środek terapeutyczny w leczeniu chorób układu krążenia o podłożu zapalnym.

Nasze wyniki pokazały, że PAD2 ma największą ekspresję wśród PADs w makrofagach THP-1 oraz jego ekspresja jest drastycznie obniżona w makrofagach M2. W związku z tym następnym krokiem naszych badań było wyciszenie PAD2 za pomocą siRNA w makrofagach THP-1 o fenotypie M1 i M2. Co ciekawe, wyciszenie PAD2 zwiększyło polaryzację makrofagów do fenotypu M2 (wzrost ekspresji markerów MRC1, ALOX15 i FCER2 (antygen CD23)), natomiast nie wpłynęło na polaryzację do fenotypu M1. Analiza proteomiczna DIA-MS makrofagów z wyciszonym PAD2 pokazała, że w komórkach tych dochodzi do wzrostu ekspresji białek związanych z przeciwwirusową wrodzoną odpowiedzią immunologiczną oraz sygnalizacją interferonu, co jest interesującą obserwacją i może stanowić punkt wyjścia do dalszych badań związanych z rolą PAD, szczególnie PAD2 w regulacji układu immunologicznego.

Cytrulinacja przez enzymy PADs jest jedną z modyfikacji potranslacyjnych, obok fosforylacji, acetylacji, metylacji, glikozylacji, itp., którym podlegają reszty aminokwasowe w białkach. Nowoczesne metody proteomiczne pozwalają również na zidentyfikowanie zmodyfikowanych białek oraz konkretnych reszt aminokwasowych, które ulegają modyfikacjom. W celu zidentyfikowania miejsc cytrulinacji w makrofagach THP-1 zastosowaliśmy metodę DIA-MS połączoną z utworzeniem hipercytrulinowanej biblioteki²⁴. Metoda ta pozwoliła na zidentyfikowanie 192 nowych miejsc cytrulinacji na 180 cytrulinowanych peptydach, które odpowiadały 152 cytrulinowanym białkom w makrofagach THP-1 o fenotypie M1 i M2. Analiza bioinformatyczna pokazała, że większość zidentyfikowanych przez nas cytrulinowanych białek w makrofagach THP-1 bierze udział w sygnalizacji przez interleukiny, degranulacji neutrofilów, programowej śmierci komórki, obróbce DNA i RNA, degradacji w proteasomach, aktywacji płytek krwi

oraz sygnalizacji przez VEGF (Rysunek 1). Jednakże funkcjonalna rola zidentyfikowanych nowych miejsc cytrulinacji w makrofagach THP-1 i ich udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej wymagają dalszych badań.



Rysunek 1. Mapa miejsc cytrulinacji zidentyfikowanych w makrofagach THP-1 różnicowanych do fenotypu M1 i M2 oraz ich przyporządkowanie do konkretnych ścieżek sygnalizacyjnych.

Podsumowując, nasze wyniki pokazały, że zahamowanie aktywności PADs za pomocą inhibitora farmakologicznego lub wyciszanie PAD2 za pomocą siRNA doprowadziło do zmiany polaryzacji makrofagów w kierunku fenotypu przeciwzapalnego M2, co może mieć kluczowe znaczenie w projektowaniu nowych strategii terapeutycznych wpływających na przeprogramowanie makrofagów. Odkryliśmy również cytrulinowany proteom makrofagów THP-1, co po dalszej walidacji może doprowadzić do znaczących korzyści klinicznych w leczeniu chorób o podłożu zapalnym.

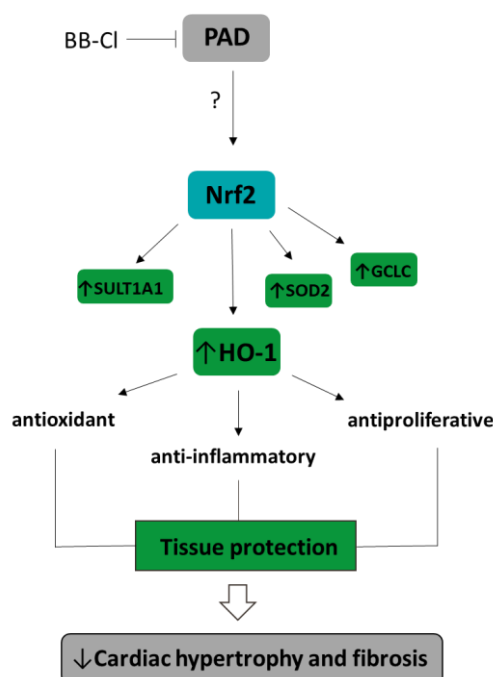
Dalszym celem naszych badań było poszukiwanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za różnicowanie fibroblastów serca do miofibroblastów. W związku z tym, że zwiększony poziom PADs został wykryty w zwłóknieniu serca, a ekspresja PADs potwierdzona w fibroblastach serca to nasze kolejne badania skupiły się na poznaniu roli PADs w różnicowaniu fibroblastów do miofibroblastów przy wykorzystaniu nowoczesnych metod proteomicznych. Wynikiem tych badań jest publikacja pt. „*Treatment of human cardiac fibroblasts with the protein arginine deiminase inhibitor BB-CI-amidine activates the Nrf2/HO-1 signaling pathway*” opublikowana w *Biomedicine & Pharmacotherapy* w 2023 roku²⁵. W pracy tej pokazaliśmy, że ludzkie fibroblasty wyizolowane z serca płodu

posiadają ekspresję mRNA dla PAD1, PAD2 i PAD4, z najliczniej reprezentowanym PAD1, a następnie PAD2. Co ważne, odkryliśmy, że poziom PAD1 był zwiększony w fibroblastach zróżnicowanych do miofibroblastów poprzez stymulację TGF- β 1 przez 24 godziny, a podawanie inhibitora pan-PAD BB-Cl-amidyny doprowadziło do obniżenia jego ekspresji. Warto zauważyć, że BB-Cl-amidyna zahamowała aktywację fibroblastów do miofibroblastów, co wykazano poprzez pomiar zmniejszonej ekspresji PAD1 i PAD2, a także markera miofibroblastów COL1A1 (łańcuch alfa 1 kolagenu typu I). Obniżenie poziomu COL1A1 po podaniu BB-Cl-amidyny było prawdopodobnie spowodowane jego degradacją, ponieważ zaobserwowaliśmy zwiększoną zawartość C-terminalnego propeptydu o masie 35 kDa - podjednostki COL1A w eksperymentach Western blot w fibroblastach i miofibroblastach stymulowanych BB-Cl-amidyną. Zatem podawanie BB-Cl-amidyny -inhibitora PAD może prowadzić do degradacji COL1A1 i w konsekwencji wywierać negatywny wpływ na różnicowanie fibroblastów do miofibroblastów.

W celu poznania molekularnych mechanizmów związanych z zahamowaniem PADs przez BB-Cl-amidynę w fibroblastach zróżnicowanych do miofibroblastów wykorzystaliśmy metody proteomiczne DIA-MS. Analiza proteomiczna wykazała zwiększoną ekspresję oksygenazy hemowej-1 (HO-1) w fibroblastach i miofibroblastach pod wpływem działania BB-Cl-amidyny, co zostało również potwierdzone technikami RT-qPCR i Western blot. Ponadto, bioinformatyczna analiza szlaków sygnalizacyjnych przeprowadzona w oparciu o dane proteomiczne wskazała na szlak odpowiedzi na stres oksydacyjny regulowany przez czynnik transkrypcyjny Nrf2 jako szlak aktywowany po podaniu BB-Cl-amidyny. Co ważne, ekspresja HO-1 jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny Nrf2. Uzyskane przez nas wyniki z proteomiki pokazały również zwiększoną ekspresję innych białek cytoprotekcyjnych regulowanych przez Nrf2 po podaniu BB-Cl-amidyny, takich jak sulfotransferaza 1A1 (SULT1A1), dysmutaza ponadtlenkowa [Mn], mitochondrialna (SOD2) i ligaza glutaminianowo-cysteinowa (GCLC). Warto podkreślić, że enzym HO-1 katalizuje degradację hemu, uwalniając biliwerdynę, tlenek węgla (CO) i żelazo, które działają jako silne cząsteczki przeciwutleniające i przeciwzapalne, wywołując działanie cytoprotekcyjne przed uszkodzeniami spowodowanymi przez stres oksydacyjny (ROS) i stany zapalne²⁶. Ponadto, kilka badań wykazało, że zwiększona ekspresja szlaku Nrf2/HO-1 prowadzi do zahamowania przerostu i zwłóknienia serca^{27,28}. Podsumowując, nasze wyniki wskazują, że zahamowanie PAD poprzez podawanie BB-Cl-amidyny aktywowało szlak sygnalizacyjny Nrf2/HO-1 w fibroblastach, co ma kluczowe znaczenie dla ochrony

komórek przed uszkodzeniami oksydacyjnymi wywołanymi przez różne czynniki stresogenne i może wywoływać korzystny efekt w przeciwdziałaniu różnicowaniu fibroblastów do miofibroblastów (Rysunek 2).

Co więcej, dane z DIA-MS wskazały na obniżenie ekspresji białek zaangażowanych w szlak sygnalizacyjny SREBP po podaniu BB-Cl-amidyny w miofibroblastach. SREBP1 może aktywować szlaki profibrotyczne poprzez indukcję aktywności transkrypcyjnej TGF- β i/lub zapobieganie egzosomalnej degradacji receptora dla TGF- β ²⁹. Zatem obniżenie ekspresji białek szlaku SREBP po podaniu inhibitora PAD – BB-Cl-amidyny może wpływać na aktywację fibroblastów do miofibroblastów.



Rysunek 2. Zahamowanie PAD przez pan-PAD inhibitor BB-Cl-amidynę prowadzi do aktywacji szlaku Nrf2/HO-1 w ludzkich fibroblastach z serca. HO-1 zapewnia ochronę tkanek poprzez działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne i antyproliferacyjne, co może wywierać efekt hamujący na przerost i zwłóknienie serca.

Zastosowanie DIA-MS w połączeniu z utworzeniem hipercytrulinowanej biblioteki pozwoliło na identyfikację 86 miejsc cytrulinacji na 85 cytrulinowanych peptydach, co odpowiadało 68 cytrulinowanym białkom w fibroblastach. Analiza bioinformatyczna wskazała, że zidentyfikowane cytrulinowane białka były zaangażowane m.in. w degranulację neutrofilów, obróbkę DNA, procesy translacji, degradację w proteasomach, odpowiedź komórkową na stres, sygnalizację przez IL-4 i IL-13, obróbkę białek w siateczce

śródpłazmatycznej i sygnalizację przez VEGF. Co więcej, nasze badania pozwoliły na odkrycie kilku nowych miejsc cytrulinacji na białkach strukturalnych, takich jak miozyna-10, miozyna-9, białko związane z mikrotubulami 4, filamina-A, filamina-C, fibronektyna, łańcuch alfa-1C tubuliny i integryna beta-1. Warto podkreślić, że cytrulinacja białek strukturalnych ma funkcjonalne konsekwencje dla fizjologii komórki. Na przykład wykazano, że cytrulinacja wimentyny pośredniczy w rozwoju zwłóknienia płuc³⁰, a cytrulinacja kolagenu II wpływa na adhezję komórek³¹. Co ważne, wiedza dotycząca zmian w cytrulinowanych białkach podczas procesu zwłóknienia może dostarczyć nowych informacji do późniejszych dogłębnych badań nad zwłóknieniem oraz umożliwić rozwój nowych środków terapeutycznych, które będą wpływać na różnicowanie fibroblastów do miofibroblastów.

Podsumowując, nasze wyniki pokazały, że zahamowanie PAD przez inhibitor BB-CI-amidynę spowodowało wzrost ekspresji enzymu HO-1 poprzez aktywację szlaku Nrf2, co może zapobiegać nadmiernemu uszkodzeniu tkanki, prowadząc w ten sposób do znacznych korzyści klinicznych w leczeniu zwłóknienia serca.

Wnioski

Do najważniejszych oryginalnych osiągnięć poznawczych cyklu przedstawionych prac należą:

1. **Aktywator enzymu ACE2 – diminazen zmienił polaryzację makrofagów do fenotypu przeciwzapalnego M2** w blaszkach miażdżycowych myszy apoE^{-/-}, co razem ze zmniejszeniem zawartości makrofagów oraz wzrostem zawartości mięśni gładkich przyczyniło się do stabilizacji blaszki miażdżycowej.
2. **Aktywator enzymu ACE2 – diminazen zmniejszył stłuszczenie wątroby**, co było związane ze spadkiem zawartości trójglicerydów oraz enzymu ALT w wątrobie, ze wzrostem cholesterolu HDL w osoczu oraz ze wzrostem ekspresji CSAD i poziomu tauryny w wątrobie myszy apoE^{-/-}.
3. **Korzystne działanie diminazenu** wpływające na zmianę polaryzacji makrofagów w blaszce miażdżycowej oraz zmniejszenie stłuszczenia wątroby może być związane ze **wzrostem ekspresji enzymu CSAD, który jest odpowiedzialny za syntezę tauryny**.
4. **Zahamowanie aktywności deiminaz białkowo-argininowych (PADs)** za pomocą inhibitora BB-CI-amidyny doprowadziło do **zmniejszenia polaryzacji**

makrofagów do fenotypu prozapalnego M1 oraz zwiększenia polaryzacji do fenotypu przeciwapalnego M2 w makrofagach THP-1, co może mieć kluczowe znaczenie w projektowaniu nowych strategii terapeutycznych wpływających na przeprogramowanie makrofagów.

5. **Wyciszenie PAD2** za pomocą siRNA w makrofagach THP-1 doprowadziło do **zmiany polaryzacji makrofagów w kierunku fenotypu przeciwapalnego M2**, co może wskazywać na ważną rolę PAD2 w regulacji odpowiedzi immunologicznej poprzez modulację polaryzacji makrofagów.
6. **Zastosowanie nowoczesnych metod proteomicznych pozwoliło na identyfikację nowych miejsc cytrulinacji w makrofagach THP-1.** Wykryte miejsca cytrulinacji znajdowały się na białkach biorących udział w sygnalizacji przez interleukiny, degranulacji neutrofilii, programowej śmierci komórki, obróbce DNA i RNA, degradacji w proteasomach, aktywacji płytek krwi oraz sygnalizacji przez VEGF.
7. **Zahamowanie PAD za pomocą inhibitora BB-CI-amidyny zmniejszyło aktywację fibroblastów do miofibroblastów**, co związane było z obniżeniem ekspresji markera miofibroblastów COL1A1 oraz ze wzrostem degradacji kolagenu.
8. **Zahamowanie PAD poprzez podawanie BB-CI-amidyny aktywowało szlak sygnalizacyjny Nrf2/HO-1 w fibroblastach**, co ma kluczowe znaczenie dla ochrony komórek przed uszkodzeniami oksydacyjnymi i może wywoływać korzystny efekt w przeciwdziałaniu różnicowaniu fibroblastów do miofibroblastów.
9. **Zastosowanie nowoczesnych metod proteomicznych pozwoliło na identyfikację nowych miejsc cytrulinacji w fibroblastach i miofibroblastach.** Wykryte miejsca cytrulinacji znajdowały się na białkach biorących udział w degranulacji neutrofilii, obróbce DNA, procesach translacji, degradacji w proteasomach, odpowiedzi komórkowej na stres, sygnalizacji przez IL-4 i IL-13, obróbce białek w siateczce śródplazmatycznej i sygnalizacji przez VEGF.

Podsumowując, nasze badania pokazały, że zahamowanie PADs oraz aktywacja ACE2 mogą wpływać na polaryzację makrofagów oraz różnicowanie fibroblastów do miofibroblastów. Ponadto, uzyskane przez nas wyniki mogą doprowadzić do opracowania nowego podejścia farmakologicznego ukierunkowanego na zmianę polaryzacji makrofagów i zahamowanie różnicowania fibroblastów do miofibroblastów, z możliwym zastosowaniem w leczeniu chorób układu krążenia o podłożu zapalnym.

Piśmiennictwo

1. Savarese G, Lund LH. Global Public Health Burden of Heart Failure. *Card Fail Rev.* 2017;3:7–11.
2. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2019;124:315–327.
3. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2010;74:213–220.
4. Sweeney M, Corden B, Cook SA. Targeting cardiac fibrosis in heart failure with preserved ejection fraction: mirage or miracle? *EMBO Mol Med.* 2020;12:e10865.
5. Wu J, He S, Song Z, et al. Macrophage polarization states in atherosclerosis. *Front Immunol.* 2023;14.
6. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2014;71:549–574.
7. Farahi L, Sinha SK, Lusis AJ. Roles of Macrophages in Atherogenesis. *Front Pharmacol.* 2021;12.
8. Nagenborg J, Goossens P, Biessen EAL, Donners MMPC. Heterogeneity of atherosclerotic plaque macrophage origin, phenotype and functions: Implications for treatment. *Eur J Pharmacol.* 2017;816:14–24.
9. Hanna RN, Shaked I, Hubbeling HG, et al. NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ Res.* 2012;110:416–427.
10. Cardilo-Reis L, Gruber S, Schreier SM, et al. Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype. *EMBO Mol Med.* 2012;4:1072–1086.
11. Bart VMT, Pickering RJ, Taylor PR, Ipseiz N. Macrophage reprogramming for therapy. *Immunology.* 2021;163:128–144.
12. Kurose H. Cardiac Fibrosis and Fibroblasts. *Cells.* 2021;10:1716.
13. Gillet LC, Navarro P, Tate S, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2012;11:O1111.016717.
14. Rosenberger G, Koh CC, Guo T, et al. A repository of assays to quantify 10,000 human proteins by SWATH-MS. *Sci Data.* 2014;1:140031.
15. Stachowicz A, Wiśniewska A, Kuś K, et al. Diminazene Aceturate Stabilizes Atherosclerotic Plaque and Attenuates Hepatic Steatosis in apoE-Knockout Mice by Influencing Macrophages Polarization and Taurine Biosynthesis. *Int J Mol Sci.* 2021;22:5861.
16. da Silva AR, Fraga-Silva RA, Stergiopoulos N, Montecucco F, Mach F. Update on the role of angiotensin in the pathophysiology of coronary atherothrombosis. *Eur J Clin Invest.* 2015;45:274–287.
17. Murakami S. Taurine and atherosclerosis. *Amino Acids.* 2014;46:73–80.
18. Murakami S, Ono A, Kawasaki A, Takenaga T, Ito T. Taurine attenuates the development of hepatic steatosis through the inhibition of oxidative stress in a model of nonalcoholic fatty liver disease in vivo and in vitro. *Amino Acids.* 2018;50:1279–1288.
19. Sartório CL, Pimentel EB, Santos RL dos, Rouver WN, Mill JG. Acute hypotensive effect of diminazene aceturate in spontaneously hypertensive rats: role of NO and Mas receptor. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2020;47:1723–1730.

20. Stachowicz A, Pandey R, Sundararaman N, Venkatraman V, Van Eyk JE, Fert-Bober J. Protein arginine deiminase 2 (PAD2) modulates the polarization of THP-1 macrophages to the anti-inflammatory M2 phenotype. *J Inflamm Lond Engl*. 2022;19:20.
21. György B, Tóth E, Tarcsa E, Falus A, Buzás EI. Citrullination: a posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38:1662–1677.
22. Al-U’ datt DGF, Allen BG, Hiram R, Alrabadi N. Current knowledge into the role of the peptidylarginine deiminase (PAD) enzyme family in cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol*. 2021;891:173765.
23. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023.
24. Fert-Bober J, Venkatraman V, Hunter CL, et al. Mapping Citrullinated Sites in Multiple Organs of Mice Using Hypercitrullinated Library. *J Proteome Res*. 2019;18:2270–2278.
25. Stachowicz A, Sadiq A, Walker B, Sundararaman N, Fert-Bober J. Treatment of human cardiac fibroblasts with the protein arginine deiminase inhibitor BB-CI-amidine activates the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2023;167:115443.
26. Ryter SW. Heme Oxygenase-1: An Anti-Inflammatory Effector in Cardiovascular, Lung, and Related Metabolic Disorders. *Antioxidants*. 2022;11:555.
27. Liu X, Pachori AS, Ward CA, et al. Heme oxygenase-1 (HO-1) inhibits postmyocardial infarct remodeling and restores ventricular function. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2006;20:207–216.
28. Meng Z, Li H-Y, Si C-Y, Liu Y-Z, Teng S. Asiatic acid inhibits cardiac fibrosis through Nrf2/HO-1 and TGF- β 1/Smads signaling pathways in spontaneous hypertension rats. *Int Immunopharmacol*. 2019;74:105712.
29. Dorotea D, Koya D, Ha H. Recent Insights Into SREBP as a Direct Mediator of Kidney Fibrosis via Lipid-Independent Pathways. *Front Pharmacol*. 2020;11:265.
30. Li FJ, Surolia R, Li H, et al. Citrullinated vimentin mediates development and progression of lung fibrosis. *Sci Transl Med*. 2021;13:eaba2927.
31. Sipilä K, Haag S, Denessiouk K, et al. Citrullination of collagen II affects integrin-mediated cell adhesion in a receptor-specific manner. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2014;28:3758–3768.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Moje zainteresowania naukowe skupiają się wokół tematyki związanej z rolą dysfunkcji mitochondriów, stresu oksydacyjnego, aktywacji inflammasomu NLRP3 oraz polaryzacji makrofagów w chorobach cywilizacyjnych (miażdżycy, niealkoholowe stłuszczenie wątroby (NAFLD)), w których ważną rolę odgrywa przewlekłe zapalenie. Wspólną osią wymienionych obszarów jest metodyka wykorzystująca techniki proteomiczne oparte o oznaczenia wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS).

W trakcie studiów doktoranckich zajmowałam się rolą mitochondrialnej dehydrogenazy aldehydowej (ALDH2) w patogenezie chorób związanych z dysfunkcją mitochondriów,

takich jak miażdżycy, NAFLD, depresja i neurodegeneracja. Pokazałam, że Alda-1, drobnocząsteczkowy aktywator ALDH2, spowodował zahamowanie miażdżycy i stłuszczenia wątroby u myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (apoE^{-/-}) – zwierzęcym modelu miażdżycy i NAFLD, wykazywał działanie przeciwdepresyjne i przeciwlękowe w zwierzęcym modelu depresji – u szczurów stresowanych w okresie prenatalnym oraz przyczynił się do poprawy obrazu histopatologicznego obserwowanego we wczesnych stadiach rozwoju choroby Alzheimera u myszy apoE^{-/-}. Zatem, farmakologiczna aktywacja ALDH2 może być nową, obiecującą strategią w leczeniu przewlekłych chorób zapalnych charakteryzujących się dysfunkcją mitochondriów i stresem oksydacyjnym. Badania realizowałam w ramach grantu Preludium NCN w latach 2011 – 2014 (N/NZ4/01145), którego rezultatem są następujące publikacje:

Stachowicz A. Olszanecki R, Suski M, Wiśniewska A, Totoń-Żurańska J, Madej J, Jawień J, Białas M, Okoń K, Gajda M, Głombik K, Basta-Kaim A, Korbut R. *Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activation by alda-1 inhibits atherosclerosis and attenuates hepatic steatosis in apolipoprotein e-knockout mice.* J Am Heart Assoc. 2014 Nov 12;3(6). pii: e001329. doi: 10.1161/JAHA.114.001329.

Stachowicz A. Głombik K, Olszanecki R, Basta-Kaim A, Suski M, Lasoń W, Korbut R. *The impact of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activation by Alda-1 on the behavioral and biochemical disturbances in animal model of depression.* Brain Behav Immun. 2015; 51:144-53.

Stachowicz A. Olszanecki R, Suski M, Głombik K, Basta-Kaim A, Adamek D, Korbut R. *Proteomic Analysis of Mitochondria-Enriched Fraction Isolated from the Frontal Cortex and Hippocampus of Apolipoprotein E Knockout Mice Treated with Alda-1, an Activator of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase (ALDH2).* Int J Mol Sci. 2017 Feb 17;18(2).doi: 10.3390/ijms18020435.

W czasie doktoratu rozpoczęłam współpracę z Instytutem Farmakologii PAN w Krakowie, która zaowocowała powstaniem kilku publikacji (lista poniżej). Współpraca dotyczyła roli dysfunkcji mitochondriów w depresji oraz mitochondrialnych mechanizmów działania leków przeciwdepresyjnych w korze czołowej i hipokampie. Do badań tych wykorzystałam metodę analizy ilościowej białek - elektroforezę dwuwymiarową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (2DE-LC-MS/MS). W pracach tych pokazaliśmy, że stres prenatalny zmienił proteom mitochondriów w korze czołowej i hipokampie oraz zmniejszył biogenezę mitochondriów. Natomiast atypowy lek przeciwdepresyjny – tianeptyna spowodował korzystne zmiany w ekspresji białek mitochondrialnych w korze czołowej i hipokampie w

zwierzęcym modelu depresji, u szczurów stresowanych prenatalnie, m.in. zwiększając ekspresję białek łańcucha transportu elektronów.

Głombik K, **Stachowicz A**, Ślusarczyk J, Trojan E, Budziszewska B, Suski M, Kubera M, Lasoń W, Wędzony K, Olszanecki R, Basta-Kaim A. *Maternal stress predicts altered biogenesis and the profile of mitochondrial proteins in the frontal cortex and hippocampus of adult offspring rats.* Psychoneuroendocrinology. 2015; 60:151-62.

Głombik K, **Stachowicz A**, Olszanecki R, Ślusarczyk J, Trojan E, Lasoń W, Kubera M, Budziszewska B, Spedding M, Basta-Kaim A. *The effect of chronic tianeptine administration on the brain mitochondria: direct links with an animal model of depression.* Mol Neurobiol. 2016 Dec;53(10):7351-7362. doi: 10.1007/s12035-016-9807-4.

Głombik K, **Stachowicz A**, Trojan E, Olszanecki R, Ślusarczyk J, Suski M, Chamera K, Budziszewska B, Lasoń W, Basta-Kaim A. *Evaluation of the effectiveness of chronic antidepressant drug treatments in the hippocampal mitochondria - A proteomic study in an animal model of depression.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2017; 78:51-60.

Głombik K, **Stachowicz A**, Trojan E, Ślusarczyk J, Suski M, Chamera K, Kotarska K, Olszanecki R, Basta-Kaim A. *Mitochondrial proteomics investigation of frontal cortex in an animal model of depression: Focus on chronic antidepressant drugs treatment.* Pharmacol Rep. 2018 Apr;70(2):322-330.

Zarówno w czasie studiów doktoranckich, jak i po uzyskaniu stopnia doktora jednym z moich głównych obszarów badawczych było poszukiwanie molekularnych mechanizmów patogenezy miażdżycy i niealkoholowego stłuszczenia wątroby. Wspólnie z zespołem Katedry Farmakologii UJ CM jako zwierzęcy model miażdżycy wykorzystaliśmy myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (apoE^{-/-}). Zespół Katedry Farmakologii UJ CM posiada wieloletnie, bogato udokumentowane doświadczenie w badaniach nad miażdżycą, bazujące na opisie zmian miażdżycowych i ich farmakologicznej korekcie. Myszy apoE^{-/-} oprócz miażdżycy rozwijają również stłuszczenie wątroby, uszkodzenia nerek oraz zmiany w mózgu odpowiadające wczesnym stadiom choroby Alzheimera, co również było przedmiotem naszego zainteresowania. Nasze badania wykazały m.in. przeciwmiażdżycowy potencjał agmatyny – endogennej poliaminy, trehalozy – naturalnie występującego disacharydu, GW9508 – aktywatora dla wolnych kwasów tłuszczowych oraz 1G244 - inhibitora dipeptydylopeptydazy 8/9. Agmatyna i trehaloza zmniejszyły również stłuszczenie wątroby u myszy apoE^{-/-}. Badania te zaowocowały powstaniem kilkunastu pracach naukowych:

Bujak- Giżycka B, Olszanecki R, Suski M, Madej J., **Stachowicz A**, Korbut R.: *Angiotensinogen metabolism in rat aorta: robust formation of proangiotensin-12*. J. Physiol. Pharmacol., 2010; 61: 679-682.

Stachowicz A, Suski M, Olszanecki R, Madej J, Okoń K, Korbut R.: *Proteomic analysis of liver mitochondria in apolipoprotein E knockout mice treated with metformin*. J. Proteomics, 2012; 77:167-75.

Suski M, Gębska A, Olszanecki R, **Stachowicz A**, Uracz D, Madej J, Korbut R.: *Influence of atorvastatin on angiotensin I metabolism in resting and TNF- α -activated rat vascular smooth muscle cells*. J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst., 2014; 15(4):378-83.

Suski M, Olszanecki R, **Stachowicz A**, Madej J, Bujak-Giżycka B, Okoń K, Korbut R.: *The influence of angiotensin-(1-7) Mas receptor agonist (AVE 0991) on mitochondrial proteome in kidneys of apoE knockout mice*. Biochim Biophys Acta., 2013; 1834(12):2463-9.

Suski M, Olszanecki R, Chmura Ł, **Stachowicz A**, Madej J, Okoń K, Adamek D, Korbut R. *Influence of metformin on mitochondrial subproteome in the brain of apoE knockout mice*. Eur J Pharmacol. 2016; 772:99-107.

Suski M, Wiśniewska A, **Stachowicz A**, Olszanecki R, Kuś K, Białas M, Madej J, Korbut R. *The influence of AICAR - direct activator of AMP-activated protein kinase (AMPK) - on liver proteome in apoE-knockout mice*. Eur J Pharm Sci. 2017; 104:406-416.

Wiśniewska A, Olszanecki R, Totoń-Żurańska J, Kuś K, **Stachowicz A**, Suski M, Gębska A, Gajda M, Jawień J, Korbut R. *Anti-Atherosclerotic Action of Agmatine in ApoE-Knockout Mice*. Int J Mol Sci. 2017 Aug 4;18(8). doi: 10.3390/ijms18081706.

Stachowicz A, Olszanecki R, Suski M, Wiśniewska A, Kuś K, Białas M, Jawień J, Korbut R. *Quantitative proteomics reveals decreased expression of major urinary proteins in the liver of apoE/eNOS-DKO mice*. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2018 Jul;45(7):711-719.

Stachowicz A, Wiśniewska A, Kuś K, Kiepusa A, Gębska A, Gajda M, Białas M, Totoń-Żurańska J, Stachyra K, Suski M, Jawień J, Korbut R, Olszanecki R. *The Influence of Trehalose on Atherosclerosis and Hepatic Steatosis in Apolipoprotein E Knockout Mice*. Int J Mol Sci. 2019 Mar 28;20(7). pii: E1552. doi: 10.3390/ijms20071552.

Suski M, Kiepusa A, Wiśniewska A, Kuś K, Skałkowska A, Stachyra K, **Stachowicz A**, Gajda M, Korbut R, Olszanecki R. *Anti-atherosclerotic action of GW9508 - Free fatty acid receptors activator - In apoE-knockout mice*. Pharmacol Rep. 2019 Aug;71(4):551-555. doi: 10.1016/j.pharep.2019.02.014.

Suski M, Wiśniewska A, Kuś K, Kiepusa A, **Stachowicz A**, Stachyra K, Czepiel K, Madej J, Olszanecki R. *Decrease of the pro-inflammatory M1-like response by inhibition of dipeptidyl peptidases 8/9 in THP-1 macrophages - quantitative proteomics of the proteome and secretome*. Mol Immunol. 2020 Nov;127:193-202. doi: 10.1016/j.molimm.2020.09.005. Epub 2020 Sep 29.

Wiśniewska A, **Stachowicz A**, Kuś K, Ulatowska-Białas M, Totoń-Żurańska J, Kiepusa A, Stachyra K, Suski M, Gajda M, Jawień J, Olszanecki R. *Inhibition of Atherosclerosis and Liver Steatosis by Agmatine in Western Diet-Fed apoE-Knockout Mice Is Associated with Decrease in Hepatic De Novo Lipogenesis and Reduction in Plasma Triglyceride/High-Density Lipoprotein Cholesterol Ratio*. Int J Mol Sci. 2021 Oct 1;22(19):10688.

Wiśniewska A, Czepiel K, **Stachowicz A**, Pomierny B, Kuś K, Kiepusa A, Stachyra K, Surmiak M, Madej J, Olszanecki R, Suski M. *The antiatherosclerotic action of IG244 - An inhibitor of dipeptidyl peptidases 8/9 - is mediated by the induction of macrophage death*. Eur J Pharmacol. 2023 Apr 5;944:175566. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175566. Epub 2023 Feb 3.

Kolejnym polem mojej aktywności naukowej było zastosowanie technik proteomicznych do projektów badawczych o charakterze klinicznym (tzw. proteomika kliniczna). Umożliwił to rozwój nowych metod badawczych, pozwalający na odejście od technik żelowych na rzecz oznaczeń ilościowych na poziomie peptydów, takich jak oznaczenia półilościowe typu *label-free quantification* (bez znakowania próbki) i *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation* (iTRAQ) (ze znakowaniem próbki). Projekty wykonywane były we współpracy z Instytutem Kardiologii UJ CM, a także Katedrą Anatomii UJ CM. W celu wdrożenia nowych metod proteomicznych (*label-free quantification*) nawiązaliśmy współpracę z Instytutem Biochemii Maxa Plancka w Martinsried. Badania dotyczyły pomiaru składu białkowego skrzepów fibrynowych uzyskanych z osocza pacjentów z zakrzepowym zespołem antyfosfolipidowym, zakrzepicą i od zdrowych ochotników. Uzyskane wyniki wskazały na ilościową zmianę składu skrzepów związaną ze zwiększoną zawartością składników dopełniacza i białek płytek krwi u pacjentów z zakrzepowym zespołem antyfosfolipidowym. Z kolei we współpracy z Katedrą Anatomii UJ CM oznaczaliśmy zmiany w proteomie serca w nadciśnieniu płucnym. Wynikiem tych badań są następujące publikacje:

Stachowicz A, Siudut J, Suski M, Olszanecki R, Korbut R, Undas A, Wiśniewski JR. *Optimization of quantitative proteomic analysis of clots generated from plasma of patients with venous thromboembolism*. Clin Proteomics. 2017 Nov 28;14:38. doi: 10.1186/s12014-017-9173-x. eCollection 2017.

Stachowicz A, Zabczyk M, Natorka J, Suski M, Olszanecki R, Korbut R, Wiśniewski JR, Undas A. *Differences in plasma fibrin clot composition in patients with thrombotic antiphospholipid syndrome compared with venous thromboembolism*. Sci Rep. 2018 Nov 23;8(1):17301. doi: 10.1038/s41598-018-35034-x.

Zabczyk M, **Stachowicz A**, Natorka J, Olszanecki R, Wiśniewski JR, Undas A. *Plasma fibrin clot proteomics in healthy subjects: Relation to clot permeability and lysis time*. J Proteomics. 2019 Sep 30; 208:103487. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103487.

Hołda MK, **Stachowicz A**, Suski M, Wojtysiak D, Sowińska N, Arent Z, Palka N, Podolec P, Kopeć G. *Myocardial proteomic profile in pulmonary arterial hypertension*. Sci Rep. 2020 Sep 1;10(1):14351. doi: 10.1038/s41598-020-71264-8.

Wreszcie ostatnie moje badania dotyczyły roli mitochondrialnego siarkowodoru (H₂S) w przeprogramowaniu makrofagów z fenotypu prozapalnego M1 na przeciwzapalny M2 w przewlekłych chorobach zapalnych: miażdżycy i NAFLD. Badania te były finansowane w ramach grantu SONATA NCN (2018-2023; 2017/26/D/NZ4/00480). Warto podkreślić, że polaryzacja makrofagów odgrywa kluczową rolę w rozwoju przewlekłego stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia, występującego zarówno w miażdżycy, jak i NAFLD, a zmiana fenotypu makrofagów z prozapalnego M1 na przeciwzapalny M2 może stanowić obiecującą strategię leczenia tych chorób. Moje badania pokazały, że mitochondrialny donator H₂S – substancja AP39 zmniejszył zmiany miażdżycowe u myszy apoE^{-/-} poprzez zmniejszenie ogólnego stanu zapalnego, nasilenie termogenezy w aorcie oraz korzystną modulację polaryzacji makrofagów. Dodatkowo, podawanie AP39 zmniejszyło otyłość i stłuszczenie wątroby u myszy na diecie wysokotłuszczowej (publikacje w przygotowaniu).

Mój sumaryczny dorobek naukowy według analizy bibliometrycznej, przygotowanej przez Bibliotekę Medyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum na podstawie baz Web of Science Core Collection i Journal Citation Reports z dnia 19.09.2023 r. obejmuje:

Liczba publikacji: **28**, w tym 27 prac oryginalnych i 1 rozdział monografii zagranicznej

Liczba publikacji w czasopismach należących do Q1: **13**

Suma Impact Factor: **113.14**

Liczba cytowań: **403**

Liczba cytowań bez autocytowań: **370**

Współczynnik Hirscha: **14**

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Pod koniec studiów doktoranckich (czerwiec 2015) odbyłam **miesięczny staż szkoleniowy w laboratorium proteomicznym CSIC/UAB Proteomics Facility (Barcelona Biomedical Research Institute (IIBB-CSIC) / Autonomous University of Barcelona (UAB), Barcelona, Hiszpania)**. Wyjazd ten pozwolił mi na naukę nowych metod proteomicznych stosowanych w badaniach biomedycznych.

Po uzyskaniu stopnia doktora nawiązałam współpracę z Profesorem Jackiem Wiśniewskim z grupy proteomicznej Profesora Matthiasa Manna w **Instytucie Biochemii Maxa Plancka w Martinsried (Niemcy), gdzie odbyłam trzy miesięczny staż naukowy** (marzec – maj 2017). W czasie stażu zdobyłam doświadczenia z przygotowania próbek i analizy danych proteomicznych przy użyciu najnowocześniejszych metod (label-free MS) i sprzętu. Wyjazd ten pozwolił także na zrealizowanie projektu badawczego dotyczącego proteomiki skrzepów z osocza od pacjentów z zakrzepowym zespołem antyfosfolipidowym. Projekt był realizowany we współpracy z Profesor Anetą Undas z Instytutu Kardiologii UJ CM. Rezultatem wyjazdu było powstanie 3 oryginalnych publikacji naukowych.

W latach 2019 – 2020 odbyłam **roczny staż podoktorski w Heart Institute, Cedars-Sinai Medical Center (Los Angeles, USA) w ramach programu Bekkera finansowanego przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej (NAWA)**. Badania naukowe prowadziłam w grupie badawczej Profesor Justyny Fert-Bober w laboratorium proteomicznym Profesor Jennifer Van Eyk. Tematem moich badań była rola enzymów deiminaz białkowo-argininowych oraz cytrulinacji w różnicowaniu fibroblastów do miofibroblastów w zwłóknieniu serca, a także w polaryzacji makrofagów do fenotypu prozapalnego oraz przeciwzapalnego. Rezultatem tego wyjazdu było powstanie 3 publikacji naukowych, w tym 2 publikacji, które są tematem osiągnięcia naukowego w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego. Współpraca badawcza z Profesor Fert-Bober jest nadal kontynuowana i uwzględniana w staraniu się o finansowanie nowych projektów badawczych we współpracy międzynarodowej finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (złożono grant OPUS uwzględniający współpracę z Profesor Fert-Bober).

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

- Prowadzenie zajęć z przedmiotu „Farmakologia” dla studentów Wydziału Lekarskiego UJ CM w latach 2012-2015.
- Opieka nad praktykami wakacyjnymi studentów.
- Uczestnictwo w organizacji i przeprowadzeniu Festiwalu Nauki w UJ CM.
- Wykład dla Towarzystwa Lekarskiego Krakowskiego pt. "Siarkowodór w patofizjologii i farmakologii schorzeń zapalnych oraz miażdżycy" (17.04.2019).
- Wykład dla uczniów VIII Liceum Ogólnokształcącego w Krakowie pt. "Zawód naukowiec" (6.04.2022).
- Artykuł - wywiad o moich badaniach pt. „Kod do leczenia chorób cywilizacyjnych” zamieszczony na stronie naukawpolsce.pl.
- Członkostwo w organizacji Human Proteome Organization (HUPO).

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Projekty badawcze

- „Mitochondrialna dehydrogenaza aldehydowa (ALDH2) jako punkt uchwytu dla nowych leków przeciwmiażdżycowych” (PRELUDIUM NCN N/NZ4/01145), finansowany przez Narodowe Centrum nauki (NCN), **kierownik grantu**, 2011 – 2014.
- „Powstawanie, przemiany i rola angiotensyny-(1-12) w układzie krążenia - badania w modelu nadciśnienia” (N N401 293939), finansowany przez MNiSzW, **wykonawca grantu**, 2010-2012.
- „Wpływ siarkowodoru (H₂S) wytwarzanego w mitochondriach na mechanizmy związane z przeprogramowaniem makrofagów – rola w miażdżycy i niealkoholowym stłuszczeniu wątroby” (SONATA NCN 2017/26/D/NZ4/00480), finansowany przez Narodowe Centrum nauki (NCN), **kierownik grantu**, 2018 – 2023.

Nagrody i wyróżnienia

- Stypendium miasta Krakowa dla szczególnie uzdolnionych studentów oraz uczestników studiów doktoranckich krakowskich uczelni wyższych, Komisja Stypendialna Miasta Krakowa i Prezydent Miasta Krakowa, 8 marca 2011
- Stypendium Doctus – Małopolski Fundusz Stypendialny dla doktorantów (2012-2015)
- Doktor nauk medycznych *summa cum laudae* (2015)
- Stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (FNP) – stypendium dla młodych, utalentowanych naukowców (2016-2017)
- Stypendium Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA) na staż podoktorski w USA (Program Bekkera) (2018)
- Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych, młodych naukowców (2019)

Szkolenia

- Targeted Proteomics Course 2016 (8-12.02.2016, ETH Zurich)
- Network Biology Workshop: Cytoscape (11-15.01.2016, Collegium Medicum UJ, Kraków)

Wystąpienia ustne na konferencjach naukowych

- XVI Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego (24-26 listopada 2011, Poznań) *Metabolizm angiotensynogenu w aortalnej szczura: powstawanie proangiotensyny-12,*
- 7th Summer Course for Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine (7-13.07.2013, Dubrownik, Chorwacja): *Proteomic analysis of liver mitochondria of apolipoprotein E knockout mice treated with metformin.*
- III Konferencja Naukowa Doktorantów Wydziału Lekarskiego i Farmaceutycznego UJ CM (9-10.05.2013, Kraków, Polska): *Analiza mitoproteomu wątroby myszy ApoE knockout leczonych Alda-1 – aktywatorem mitochondrialnej dehydrogenazy aldehydowej (ALDH2).*

- IV Konferencja Naukowa Doktorantów Wydziału Lekarskiego i Farmaceutycznego UJ CM (29-30.05.2014, Kraków, Polska): *The effect of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activation by Alda-1 in the prenatally stressed rats: behavioral, molecular and proteomic data.*
- V Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum (28-29.05.2015, Kraków, Polska): *Wpływ aktywacji mitochondrialnej dehydrogenazy aldehydowej (ALDH2) przez Alda-1 na zmiany neurodegeneracyjne w mózгах myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E.*
- 2nd Central European Biomedical Congress (15-18.06.2016, Kraków, Polska): *Proteomic analysis of mitochondria isolated from the frontal cortex and hippocampus of apolipoprotein E knockout mice treated with Alda-1, an activator of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2).*
- Congress BIO 2018 (18-21.09.2018, Gdańsk, Poland): *Proteomics of plasma fibrin clot in antiphospholipid syndrome.*

Wystąpienia posterowe na konferencjach naukowych

- 6th European Meeting for vascular biology & medicine (21-24 września 2011, Kraków), *Angiotensinogen metabolism in aorta and heart of hypertensive rats*, Stachowicz A., Bujak-Giżycka B., Suski M., Madej J., Olszanecki R., Korbut R.
- II Konferencja Naukowa Doktorantów Wydziału Lekarskiego i Farmaceutycznego UJ CM (18.05.2011, Kraków, Polska): *Mitochondrialna dehydrogenaza aldehydowa jako punkt uchwytu dla nowych leków przeciwmiażdżycowych*. Stachowicz A
- Proteomic forum 2013 (17-21.03.2013, Berlin, Niemcy): *Proteomic analysis of liver mitochondria of atherosclerotic apoE-knockout mice treated with Alda-1 – an activator of mitochondrial Aldehyde dehydrogenase (ALDH2)*. Stachowicz A, Suski M, Olszanecki R, Madej J, Wiśniewska A, Jawień J, Białas M, Okoń K, Korbut R.
- 7th Summer Course for Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine__ (7-13.07.2013, Dubrownik, Chorwacja): *Proteomic analysis of liver mitochondria of atherosclerotic apoE-knockout mice treated with Alda-1 – an activator of mitochondrial Aldehyde dehydrogenase (ALDH2)*. Stachowicz A.
- XVIII International Congress of the Polish Pharmacological Society (23-25.05.2013, Kazimierz Dolny, Polska): *Proteomic analysis of liver mitochondria of atherosclerotic apoE-knockout mice treated with Alda-1 – an activator of mitochondrial aldehyde*

dehydrogenase (ALDH2). Stachowicz A., Suski M, Olszanecki R, Madej J, Wiśniewska A, Jawień J, Białas M, Okoń K, Korbut R.

- 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (13-18.07.2014, Kapsztad, RPA): *The effect of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activation by Alda-1 in the prenatally stressed rats: behavioral, molecular and proteomic data*. Stachowicz A., Glombik K, Suski M., Basta-Kaim A., Olszanecki R., Korbut R.
- 13th Human Organization World Congress (5-8.10.2014, Madryt, Hiszpania): *Proteomic analysis of the frontal cortex and the hippocampus mitochondria in the animal models of depression*. Stachowicz A., Glombik K, Suski M., Basta-Kaim A., Olszanecki R., Korbut R.
- Recent Advances in Omics Research and Dissemination Conference of the Omicron Project (23-24.10.2014, Kraków, Polska): *Proteomic analysis of the frontal cortex and the hippocampus mitochondria in the animal models of depression*. Stachowicz A., Glombik K, Suski M., Basta-Kaim A., Olszanecki R., Korbut R.
- 7th World Congress on Targeting Mitochondria (24-26.10.2016, Berlin, Niemcy): *Proteomic analysis of the liver mitochondria isolated from the double (apolipoprotein E and endothelial nitric oxide synthase) knockout mice reveals decreased expression of major urinary proteins (MUPs)*. Stachowicz A., Olszanecki R., Suski M., Kuś K., Białas M., Jawień J., Korbut R.
- 16th Human Proteome Organization World Congress (17-21.09.2017, Dublin, Irlandia): *Optimization of quantitative proteomic analysis of clots generated from plasma of patients with venous thromboembolism*. Stachowicz A., Siudut J., Suski M., Olszanecki R., Korbut R., Undas A., Wiśniewski JR.
- 17th Human Proteome Organization World Congress (30.09-3.10.2018, Orlando, USA): *Differences in plasma fibrin clot composition in patients with thrombotic antiphospholipid syndrome compared with venous thromboembolism*. Stachowicz A., Ząbczyk M., Natorska J., Suski M., Olszanecki R., Korbut R., Wiśniewski JR., Undas A.
- 44th FEBS Congress (6-11.07.2019, Kraków, Polska): *The influence of diminazene on atherosclerosis and hepatic steatosis in apolipoprotein E knockout mice*. Stachowicz A., Wiśniewska A., Kuś K., Kiepusa A., Białas M., Totoń-Żurańska J., Stachyra K., Suski M., Jawień J., Korbut R., Olszanecki R.

- US HUPO 2021 Annual Conference (8-13.03.2021, wirtualna konferencja): *Role of posttranslational modification, citrullination in polarization to proinflammatory and anti-inflammatory macrophages*. Stachowicz A., Fert-Bober J.
- American Heart Association Scientific Sessions 2021 (13-15.11.2021, wirtualna konferencja): *Protein Citrullination Landscape of Human Coronary Atherosclerosis*. Stachowicz A., Mao C., Hixson J., Jackson FR., Vander Heide R., Van Eyk JE., Herrington DM., Fert-Bober J.
- Human Proteome Organization World Congress 2022 (4-8.12.2022, Cancun, Meksyk): *Proteomic analysis of bone marrow-derived macrophages (BMDM) polarized to proinflammatory and anti-inflammatory phenotype: the role of mitochondria-targeted hydrogen sulfide*. Stachowicz A., Czepiel K, Suski M, Olszanecki R.

Recenzje w czasopismach naukowych

Jestem recenzentem w czasopismach z listy JCR, włączając w to takie periodyki, jak:

- Proteomics
- European Journal of Pharmacology
- PLOS ONE
- Scientific Reports
- Hepatology International
- JACC
- Clinical Proteomics
- Psychiatry Research
- Journal of Proteomics
- PeerJ
- Marine Drugs
- International Journal of Molecular Sciences
- Free Radical Research
- Brain Research
- Animals
- Drug Development Research
- Neurochemical Research
- Pharmacological Reports
- Medical Science Monitor
- Molecules

- Journal of Integrative Neuroscience
- Antioxidants

A. Schlein

.....
(podpis wnioskodawcy)