



**Uniwersytet  
Gdański**

**Wydział Biologii**  
Uniwersytetu Gdańskiego

*Mgr Daria Korewo-Labelle*

„Wpływ suplementacji witaminą D<sub>3</sub>  
na mitochondrialny metabolizm tlenowy  
i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie  
podczas długotrwałej ekspozycji  
na działanie glikokortykosteroidów”

“The impact of vitamin D<sub>3</sub> treatment  
on mitochondrial oxidative metabolism  
and neuroprotection in the rat hippocampus during  
long-term glucocorticosteroid exposure”

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: prof. UG, dr hab. Jana Jacka Kaczora,  
dr Mateusza Jakuba Karni  
Katedrze Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii,  
Uniwersytet Gdański

GDAŃSK 2024

*Pragnę wyrazić ogromną wdzięczność  
Panu dr hab. Janowi Jackowi Kaczorowi, prof. UG  
za poświęcony czas, cierpliwość, ukierunkowanie mojego rozwoju naukowego a także  
nieocenioną pomoc i bezcenne wskazówki w trakcie przygotowania niniejszej rozprawy.*

*Serdecznie dziękuję dr Mateuszowi Karnii  
za okazaną życzliwość, pomoc naukową  
i wspaniałą atmosferę pracy naukowo-badawczej.*

*Serdecznie dziękuję dr Dorocie Myślińskiej  
za wsparcie, przekazaną mi wiedzę w zakresie neurochirurgii zwierzęcej  
i wprowadzenie do pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi.*

*Dziękuję moim rodzicom, mężowi i przyjaciołom  
za ogromne wsparcie i motywacje.*

# Spis treści

|   |    |
|---|----|
| Objaśnienie skrótów stosowanych w pracy                     | 6  |
| 1. Streszczenie pracy w języku polskim                      | 9  |
| 2. Streszczenie w języku angielskim                         | 12 |
| 3. Wprowadzenie   | 15 |
| 3.1. Fizjologia reakcji na stresor                          | 15 |
| 3.2. Molekularne mechanizmy działania glikokortykosteroidów | 18 |
| 3.3. Allostaza i przeciążenie allostatyczne                 | 19 |
| 3.4. Ekspozycja na zimno                                    | 21 |
| 3.5. Glikokortykosteroidy w medycynie                       | 24 |
| 3.6. Hipokamp   | 26 |
| 3.6.1. Neuroprotektoryjne szlaki sygnałowe w hipokampie     | 27 |
| 3.6.2. Wpływ glikokortykosteroidów na hipokamp              | 30 |
| 3.7. Mitochondria   | 32 |
| 3.7.1. Metabolizm i bioenergetyka neuronów                  | 34 |
| 3.7.2. Reaktywne formy tlenu i stres oksydacyjny            | 37 |
| 3.8. Witamina D   | 40 |
| 4. Cel badań  | 45 |
| 5. Hipotezy   | 46 |
| 6. Publikacje naukowe                                       | 47 |
| 6.1. Artykuł 1  | 47 |
| 6.1.1. Oświadczenia współautorów                            | 49 |
| 6.2. Artykuł 2  | 73 |
| 6.2.1. Oświadczenia współautorów                            | 75 |
| 7. Materiały i metody                                       | 94 |
| 7.1. Informacje dotyczące zwierząt                          | 94 |
| 7.2. Projekt eksperymentu                                   | 95 |
| 7.2.1. Ekspozycja na działanie egzogennych GK               | 95 |
| 7.2.2. Ekspozycja na działanie endogennych GK               | 95 |
| 7.3. Pobieranie tkanek                                      | 97 |
| 7.4. Oznaczanie poziomu metabolitów witaminy D <sub>3</sub> | 97 |
| 7.5. Kinetyka reakcji enzymatycznych                        | 97 |
| 7.5.1. Przygotowanie tkanki do badań                        | 97 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 7.5.2. | Oznaczanie aktywności syntazy cytrynianowej (CS)  | 98  |
| 7.5.3. | Oznaczenie aktywności oksydazy cytochromu c (COX)   | 98  |
| 7.5.4. | Oznaczanie zawartości grup sulfhydrylowych (-SH)  | 98  |
| 7.5.5. | Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA)   | 99  |
| 7.5.6. | Oznaczanie poziomu 8-izoprostanów   | 99  |
| 7.6.   | Ilościowa analiza białek  | 100 |
| 7.6.1. | Przygotowanie tkanki do analizy   | 100 |
| 7.6.2. | Procedura western blot  | 101 |
| 7.7.   | Analiza statystyczna  | 105 |
| 8.     | Wyniki  | 106 |
| 8.1.   | Stężenie 25(oh)d <sub>3</sub> i metabolitów witaminy d w surowicy szczurów                    | 106 |
| 8.2.   | Masa hipokampa i masa ciała szczurów  | 106 |
| 8.3.   | Ocena poziomu receptorów vdr, mr oraz gr  | 107 |
| 8.4.   | Zawartość białek związanych z neuroprotekcją  | 108 |
| 8.5.   | Poziomu rbm3 i nfl w hipokampie   | 110 |
| 8.6.   | Poziomy białek mitochondrialnego metabolizmu tlenowego  | 111 |
| 8.7.   | Aktywność enzymów mitochondrialnego metabolizmu tlenowego                                     | 112 |
| 8.8.   | Oznaczanie markerów uszkodzeń wolnorodnikowych w hipokampie                                   | 113 |
| 9.     | Dyskusja  | 115 |
| 9.1.   | Długotrwała ekspozycja na działanie DEXA  | 115 |
| 9.2.   | Długotrwała ekspozycja na działanie endogennych GK  | 115 |
| 9.2.1. | Zmiany atroficzne hipokampa w wyniku działania endogennych GK                                 | 115 |
| 9.2.2. | Wpływ endogennych gk na indukcję stresu oksydacyjnego w hipokampie                            | 117 |
| 9.2.3. | Potencjał ochronny witaminy d w warunkach długotrwałej ekspozycji na działanie endogennych GK | 119 |
| 10.    | Podsumowanie i wnioski  | 123 |
| 10.1.  | Długotrwała ekspozycja na działanie dexa  | 123 |
| 10.2.  | Długotrwała ekspozycja na działanie endogennych GK  | 123 |
| 11.    | Spis ilustracji   | 124 |
| 12.    | Spis tabeli   | 127 |
| 13.    | Bibliografia  | 128 |

## Objaśnienie skrótów stosowanych w pracy

**1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** – kalcytriol

**11β-HSD** – dehydrogenaza 11β-hydroksysteroidowa

**25(OH)D<sub>3</sub>** – kalcyfeydiol

**4HNE** – 4 hydroksynonenal

**ACTH** – hormon adrenokortykotropowy; kortykotropina

**ADP** – adenzynodifosforan

**Akt** – kinaza serynowo-treoninowa

**AMPK** – 5' kinaza białkowa aktywowana monofosforanem adenozy

**ATP** – adenzynotryfosforan

**AVP** – hormon antydiuretyczny, wazopresyna

**BAT** – brunatna tkanka tłuszczowa

**BDNF** – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego

**CA 1-3** – *cornu ammonis* 1-3

**CaMK** – kinaza białkowa zależna od wapnia

**CKT** – cykl kwasu trikarboksylowego

**CoA** – acetylo koenzym A

**CoQ** – koenzym Q

**COX** – oksydaza cytochromu c

**COX II** – oksydaza cytochromu c, podjednostka II

**COX IV** – oksydaza cytochromu c, podjednostka IV

**CREB** – białko wiążące element odpowiedzi cAMP

**CRF** – czynnika uwalniającego kortykotropinę

**CRH** – kortykoliberyna; hormon uwalniający kortykotropinę

**CS** – syntaza cytrynianowa

**DEXA** – deksametazon

**EDTA** – kwas wersenowy

**EER** – receptor estrogenowy

**ELISA** – test immuno-enzymatyczny

**ERK** – kinaza białkowa regulowana pozakomórkowo

**FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy

**FADH<sub>2</sub>** – dinukleotyd flawinoadeninowy

**FGF-2** – czynnik wzrostu fibroblastów-2  
**GABA** – kwas gamma-aminomasłowy  
**GK** – glikokortykosteroidy  
**GR** – receptor glikokortykosteroidowy  
**GRE** – elementami odpowiedzi na glikokortykosteroidy  
**GSH** – zredukowana forma glutationu  
**GSSG** – utleniona forma glutationu  
**IGF-1** – insulinopodobny czynnik wzrostu-1  
**IGF1R** – receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu-1  
**IGFBP** – białko wiążące IGF  
**JNK** – kinaza białka c-Jun  
**KORT** – kortykosteron  
**LDH** – kompleks dehydrogenazy mleczanowej  
**LDL** – utlenione lipoproteiny o niskiej gęstości  
**MAPK** – kinaza białkowa aktywowana mitogenem  
**MARRS** – błonowe białko wiążące steroidy  
**MDA** – aldehyd dimalonowy  
**MR** – receptor mineralokortykosteroidowy  
**mBDNF** – dojrzała forma neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego  
**MCT** – białko transportujące mleczań  
**NADH** – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy  
**NF-κB** – czynnik jądrowy kappa B  
**NFL** – łańcuchy lekkie neurofilamentów  
**NGF** – czynnik wzrostu nerwów  
**NMDA** – receptor N-metylo-D-asparaginianowy  
**pAKT** – fosforylowana kinaza serynowo-treoninowa  
**PGC-1α** – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów koaktywator gamma 1α  
**P75NTR** – receptor neurotrofiny p75  
**PDH** – kompleks dehydrogenazy pirogronianowej  
**PI3K** – kinaza 3-fosfoinozytydu  
**PKC** – kinaza białkowa C

**PLC $\gamma$**  – fosfolipaza C-gamma  
**PPN** – oś podwzgórze – przysadka mózgowa – kora nadnerczy  
**proBDNF** – prekursorowa forma neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego  
**PTH** – parathormon  
**RBM3** – białko wiążące RNA 3  
**PUFA** – wielonienasycone kwasy tłuszczowe  
**RFT** – reaktywne formy tlenu  
**RFTiA** – reaktywne formy tlenu i azotu  
**RhoA** – kinaza związana z Rho  
**RXR** – receptor retinoidu X  
**SH** – grupy sulfhydrylowe  
**TNF-1 $\alpha$**  – czynnik martwicy nowotworów alfa  
**TrkB** – kinaza receptora tropomiozyny B  
**VDBP** – białko wiążące witaminę D  
**VDR** – receptor witaminy D  
**VDRE** – element odpowiedzi witaminy D  
**VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego  
**WHO** – Światowa Organizacja Zdrowia



# 1. Streszczenie pracy w języku polskim

**Wprowadzenie:** Powszechnie wiadomo, że jednym z głównych układów odpowiedzi na stresor jest oś podwzgórze-przysadka mózgowa-kora nadnerczy (PPN), która generuje i moduluje poziom glikokortykosteroidów (GK) w organizmie. Niekorzystne warunki środowiskowe mogą doprowadzić do nadaktywności osi PPN indukując hipersekrecję GK. Hipokamp, wydaje się być szczególnie wrażliwy na negatywne skutki ekspozycji na działanie GK. Podczas wysokiego ich poziomu obserwuje się obniżenie objętości hipokampa, jak również zmiany morfologiczne, metaboliczne i funkcjonalne.

Głównym celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu 28 dniowej suplementacji witaminy D<sub>3</sub> w dawce 600 IU/ kg/ dzień na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

**Materialy i metody:** Badania zostały wykonane za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Badań na Zwierzętach w Bydgoszczy (nr 10/2019). W prowadzonych badaniach wykorzystano dwa modele *in vivo* powtarzanej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów. Model egzogenny, związany z podawaniem syntetycznego GK, deksametazonu (DEXA) oraz endogenny, poprzez aktywację osi PPN indukowaną zanurzeniem w zimnej wodzie. Badania przedstawione w niniejszej rozprawie zostały wykonane na szczurach szczepu Wistar, losowo podzielonych na 6 grup: grupę kontrolną, otrzymującą dootrzewnowo 0,9 % roztworu NaCl (n = 4-6); grupę otrzymującą dootrzewnowo roztwór DEXA w dawce 2 mg/ kg/ dzień i suplementowane witaminą D<sub>3</sub> dawce 600 IU/ kg/ dzień (n = 7-8); grupę otrzymującą dootrzewnowo roztwór DEXA w dawce 2 mg/ kg/ dzień i suplementowaną olejem roślinnym (placebo) (n = 6-7); grupę poddawaną cyklicznej ekspozycji na zimno poprzez zanurzenie w wodzie o temperaturze 0-4°C (60 minut dziennie), suplementowaną witaminą D<sub>3</sub> (n = 8-9); grupę poddawaną zanurzeniu w zimnej wodzie i suplementowaną placebo (n = 8-9); grupę poddawaną zanurzeniu w ciepłej wodzie (34-36°C) (n = 6). Pierwszego i ostatniego dnia eksperymentu zwierzęta zostały zważone, pobrano im krew z żyły ogonowej. Stężenie kortykosteronu i metabolitów witaminy D w osoczu oznaczono za pomocą metod: kolejno testu immunoenzymatycznego ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) oraz chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Po uśmierceniu zwierząt, hipokampy wyizolowano, zważono na wadze

analitycznej i poddano homogenizacji. Poziom specyficznych receptorów wiążących GK oraz witaminę D, jak również poziom białek związanych z neuroprotekcją i mitochondrialnym metabolizmem energetycznym (kompleks IV łańcucha oddechowego) oceniono na podstawie wyników uzyskanych metodą Western blot. Aktywność enzymatyczną syntazy cytrynianowej oraz oksydazy cytochromu c, zmierzono za pomocą metod kinetycznych. Następnie poziom wolnorodnikowych uszkodzeń lipidów i białek w hipokampie oceniono wykorzystując metodę ELISA oraz metod spektrofotometrycznych.

**Wyniki:** W pracy wykazano, że długotrwała ekspozycja na działanie GK, zarówno syntetycznych, jak i związanych z indukowaniem aktywności osi PPN, powoduje obniżenie masy hipokampa. Suplementacja witaminą D<sub>3</sub> wpłynęła ochronnie na masę hipokampa przy cyklicznym podawaniu DEXA w przeciwieństwie do ekspozycji na zimno. Zaobserwowano częściową modulację poziomu receptora glikokortykosteroidowego (GR), wzrost poziomu fosforylowanej kinazy serynowo-treoninowej (pAkt), dojrzałej formy neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (mBDNF), podjednostki II oksydazy cytochromu c (COX II) oraz wzrost aktywności syntazy cytrynianowej. Z kolei długotrwała ekspozycja na zimno skutkowała wzrostem poziomu kortykosteronu w osoczu zwierząt, a włączona suplementacja witaminą D<sub>3</sub> wpłynęła jedynie ochronnie na mitochondrialny metabolizm tlenowy i częściowe wyciszenie stresu oksydacyjnego w hipokampie.

**Wnioski:** Na podstawie zaprezentowanych w pracy wyników można stwierdzić, że suplementacja witaminą D<sub>3</sub> częściowo chroni hipokamp przed negatywnym działaniem GK poprzez wpływ na mitochondrialny metabolizm energetyczny oraz białka związane z neuroprotekcją. Ochronne działanie witaminy D<sub>3</sub> koncentruje się w szczególności na neurobiologicznych efektach związanych z farmakoterapią DEXA. Interesującym jest, że suplementacja witaminą D<sub>3</sub> również częściowo chroniła hipokamp zwierząt narażonych na stres związany z zimnem przed zaburzeniami w mitochondrialnym metabolizmie tlenowym oraz uszkodzeniami wywołanymi stresem oksydacyjnym. Wyniki tych badań mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia neurobiologicznych mechanizmów działania witaminy D w warunkach zwiększonej aktywności osi PPN, jak również w trakcie terapii steroidowej.

Wyniki badań uzyskane w ramach realizacji niniejszej dysertacji doktorskiej częściowo zostały opublikowane w dwóch oryginalnych artykułach:

- Karnia, M.J.; **Korewo, D.**; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* **2021**, *13*, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936> (**IF = 4,8; MEiN = 140**).
- **Korewo-Labelle, D.**; Karnia, M.J.; Myślińska, D.; Kaczor, J.J. Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13941. <https://doi.org/10.3390/ijms241813941> (**IF = 4,9; MEiN = 140**)

## 2. Streszczenie w języku angielskim

**Introduction:** It is well known that one of the main stress response systems is the hypothalamic-pituitary-adrenal cortex (HPA) axis, which generates and modulates glucocorticosteroid (GC) levels in the body. Adverse environmental conditions may lead to overactivity of the HPA axis inducing hypersecretion of GC. The hippocampus, it seems, is particularly sensitive to the negative effects of GC exposure. High levels of GC affect its volume reduction as well as morphological, metabolic, and functional disturbance.

The main objective of my dissertation was to determine the effects of 28 days of vitamin D<sub>3</sub> supplementation at a dose of 600 IU/ kg/ day on mitochondrial oxidative metabolism and neuroprotection in the rat hippocampus during long-term exposure to glucocorticosteroids.

**Materials and Methods:** The study was performed with the approval of the Local Ethical Committee for Animal Research in Bydgoszcz, Poland (No. 10/2019). The conducted studies used two *in vivo* models of repeated exposure of animals to GC: exogenous, associated with the administration of the synthetic GC, dexamethasone (DEXA), and endogenous, through activation of the HPA axis induced by immersion in cold water. The studies presented in this dissertation were performed on Wistar rats, randomly divided into 6 groups: a control group receiving intraperitoneal 0.9% NaCl solution (n = 4-6); a group receiving intraperitoneal DEXA solution at a dose of 2 mg/ kg/day and supplemented with vitamin D<sub>3</sub> at a dose of 600 IU/ kg/day (n = 7-8); a group receiving intraperitoneal DEXA solution at a dose of 2 mg/ kg/day and supplemented with vegetable oil (placebo) (n = 6-7); a group subjected to cyclic cold exposure by immersion in 0-4°C water (60 minutes per day), supplemented with vitamin D<sub>3</sub> (n = 8-9); a group subjected to cold water immersion and supplemented with placebo (n = 8-9); a group subjected to warm water immersion (34-36°C) (n = 6). On the first and last day of the experiment, the animals were weighed, and blood was drawn from the tail vein. Plasma concentrations of corticosterone and vitamin D metabolites were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) sequentially. After the animals were sacrificed, the hippocampus were isolated, weighed, and homogenized. The levels of specific GC and vitamin D binding receptors, as well as the levels of proteins associated with

12

neuroprotection and mitochondrial energy metabolism (respiratory chain complex IV), were assessed by the Western blot. The enzymatic activities of citrate synthase and cytochrome c oxidase were measured by kinetic methods. Then, the level of free radical damage to lipids and proteins in the hippocampus was assessed using ELISA and spectroscopic methods.

**Results:** The study showed that long-term exposure to GC, both synthetic and those associated with induction of HPA axis activity, causes a decrease in hippocampal mass. Vitamin D<sub>3</sub> supplementation had a protective effect on hippocampal mass with cyclic DEXA treatment in contrast to cold exposure. A partial modulation of glucocorticosteroid receptor (GR) levels, an increase in phosphorylated serine/threonine kinase (pAkt), the mature form of brain-derived neurotrophic factor (mBDNF), cytochrome c oxidase subunit II (COX II) and an increase in citrate synthase activity were observed. In turn, long-term exposure to cold increased the level of corticosterone in the animals' plasma. The included vitamin D<sub>3</sub> supplementation only had a protective effect on mitochondrial oxygen metabolism and partially reduced the oxidative stress in the hippocampus.

**Conclusions:** Based on the results presented in this paper, it can be concluded that vitamin D<sub>3</sub> supplementation partially protects the hippocampus from the negative effects of GC by affecting mitochondrial energy metabolism and proteins associated with neuroprotection. The protective effects of vitamin D<sub>3</sub> are particularly focused on the neurobiological effects associated with DEXA pharmacotherapy. It is interesting to note that vitamin D<sub>3</sub> supplementation also partially protected the hippocampus of animals exposed to cold stress from abnormalities in mitochondrial oxygen metabolism and oxidative stress-induced damage. The results of this study may contribute to a better understanding of the neurobiological mechanisms of vitamin D action under conditions of increased HPA axis activity, as well as during steroid therapy.

The research results obtained during this dissertation have been partially published in two original articles:

- Karnia, M.J.; **Korewo, D.**; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of

Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* **2021**, *13*, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936> (IF = **4,8**; MEiN = **140**).

- **Korewo-Labelle, D.**; Karnia, M.J.; Myślińska, D.; Kaczor, J.J. Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13941. <https://doi.org/10.3390/ijms241813941> (IF = **4,9**; MEiN = **140**)

### 3. Wprowadzenie

#### 3.1. Fizjologia reakcji na stresor

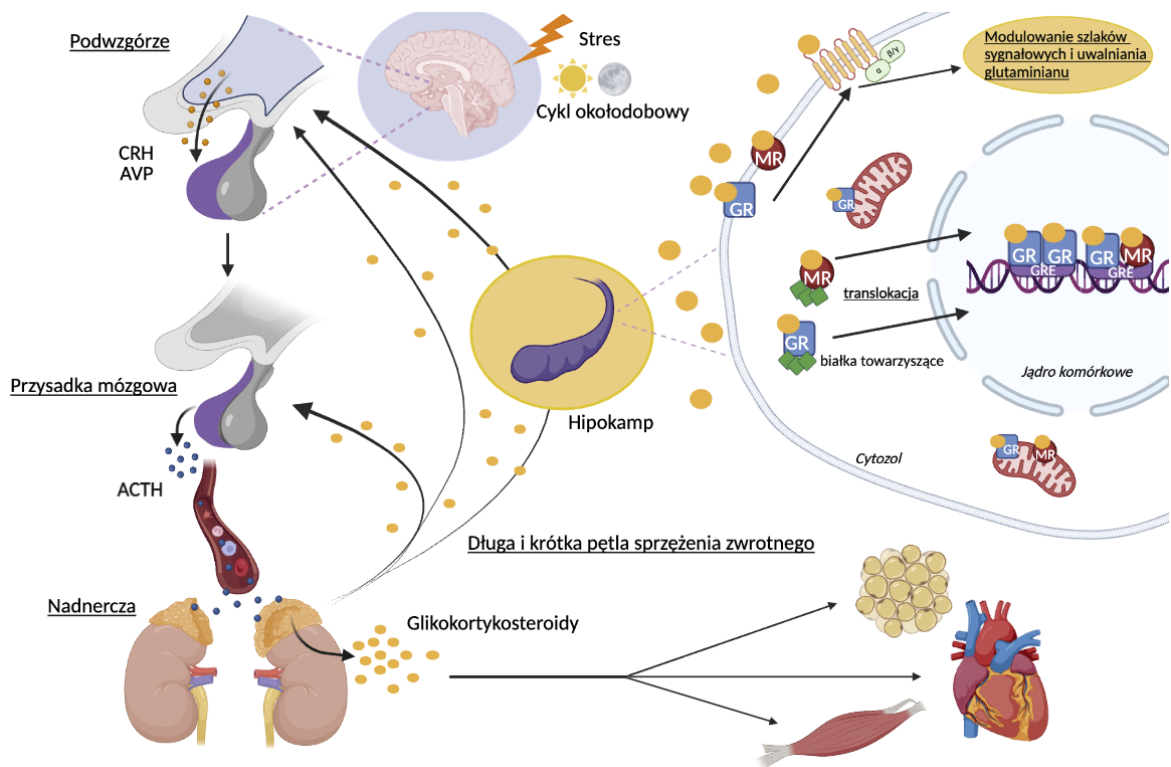
Pojęciem stresu opisuje się wszelkie stresujące doświadczenia (stresory), które wywołują reakcje fizjologiczne i behawioralne w organizmie wytrącając go z homeostazy (Chu i wsp., 2023). Warto podkreślić słowa Hansa Selye'a: „stresem nie jest to, co nam się przydarza, ale to jak reagujemy” (Selye, 1979).

Według koncepcji Selye'ego można wyróżnić dwa rodzaje stresu: pozytywny, mobilizujący do działania, nazywany eustresem oraz ten związany z przykrymi, nieprzyjemnymi uczuciami czy zdarzeniami, określany, jako dystres. Oba rodzaje stresu mogą być szkodliwe dla organizmu, jeżeli działają zbyt długo lub zbyt intensywnie. Jednak eustres wywołuje mniejsze szkody w porównaniu z dystresem (Selye, 1976). Podział stresu na „dobry lub zły” według Dhabhar jest definiowany zależnie od czasu trwania biologicznej reakcji stresowej oraz jej skutków (Dhabhar, 2014). W istocie czas jest główną cechą odpowiedzi organizmu na stresor. Dlatego pojęcie krótkotrwałego stresu odnosi się do tego, który trwa od kilku minut do paru godzin, natomiast przewlekły, długotrwały stres określany jest, jako utrzymujący się przez kilka godzin dziennie w okresie tygodni lub nawet miesięcy (Dhabhar i Mcewen, 1997). Większość reakcji fizjologicznych w odpowiedzi na ostry stresor wyzwała mechanizm „walki lub ucieczki”. Wpływa na regulację ośrodkowego układu nerwowego (OUN), moduluje pracę układu sercowo-naczyniowego, metabolizm, a także odpowiedź układu immunologicznego umożliwiając próbę przetrwania (Dhabhar, 2018).

Powszechnie wiadomo, że do głównych układów odpowiedzi na stresory zalicza się oś współczulno-nadnerczową oraz oś podwzgórze – przysadka mózgowa – kora nadnerczy (PPN) (Mifsud i Reul, 2018). Do reakcji o szybkim charakterze zalicza się aktywację osi współczulno-nadnerczowej. Prowadzi ona do zwiększonego wydzielania adrenaliny i noradrenaliny z rdzenia nadnerczy do krążenia oraz sekrecję norepinefryny z nerwów współczulnych powodując wzrost jej poziomu w mózgu (Joëls i Baram, 2009). Późniejsza reakcja organizmu wynika z aktywności osi PPN, która odpowiada za uwalnianie i regulację poziomu glikokortykosteroidów (GK). W odpowiedzi na określony czynnik jądro przysadkowe podwzgórze uwalnia kortykoliberynę (CRH) oraz wazopresynę (AVP), co sygnalizuje przedniemu płatowi przysadki sekrecję

hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) do krwioobiegu. Następnie ACTH wpływa na wzmożone uwalnianie GK przez korę nadnerczy (Chu i wsp., 2023) (Rycina 1.). GK to grupa małych, lipofilnych hormonów steroidowych, syntetyzowanych z ich prekursora, cholesterolu, w wieloetapowej kaskadzie reakcji enzymatycznych (Rycina 2.).

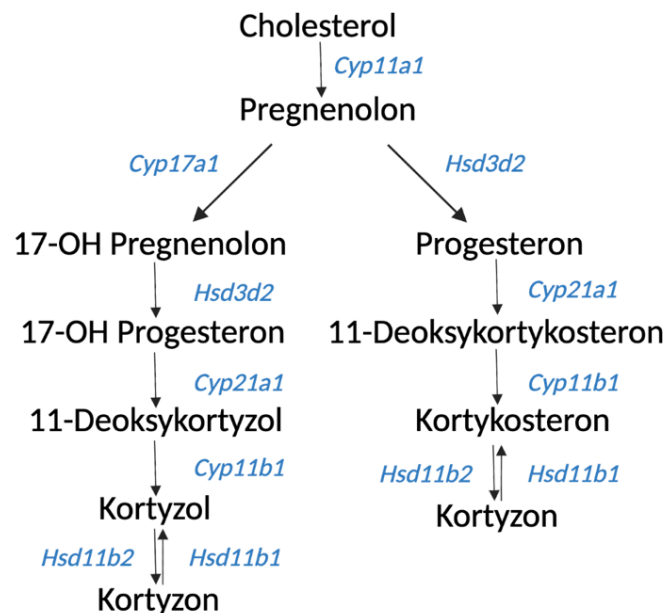
Warto podkreślić, iż GK wykazują 24-godzinny rytm dobowy wpływając na funkcjonowanie mózgu, autonomicznego układu nerwowego oraz układu sercowo-naczyniowego (Azmi i wsp., 2021). W naturalnych warunkach niski poziom GK występuje w pierwszych fazach snu i systematycznie wzrasta, osiągając swój szczytowy poziom kilka minut przed przebudzeniem (Scher i wsp., 2009)



Rycina 1. Wydzielanie glikokortykosteroidów poprzez aktywność osi podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowej oraz ich wewnątrzkomórkowe działanie poprzez mechanizmy genomowe i niegenomowe w hipokampie. **Skróty:** ACTH, adrenokortykotropina; AVP, wazopresyna; CRH, kortykoliberyna; GR, receptor glikokortykostroidowy; GRE, element odpowiedzi na glikokortykosteroidy; MR, receptor mineralokortykosteroidowy. Opracowanie własne na podstawie Gray i wsp., 2017 oraz Sawati i wsp., 2015.



W końcowym etapie syntezy GK, w wyniku reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę 11 $\beta$ -hydroksysteroidową (11 $\beta$ -HSD), nieaktywny kortyzon zostaje przekształcony do aktywnej biologicznie formy kortyzolu (u ludzi) i kortykosteronu (u gryzoni). Enzym 11 $\beta$ -HSD występuje w dwóch izoformach: 11 $\beta$ -HSD1, obecna m.in. w wątrobie, tkance tłuszczowej, mięśniach szkieletowych oraz 11 $\beta$ -HSD2 zlokalizowana głównie w nerkach (Kilgour i wsp., 2015; Morgan i wsp., 2022). 11 $\beta$ -HSD1 i 11 $\beta$ -HSD2 katalizują wzajemną konwersję GK kontrolując tym samym procesy syntezy/regeneracji, a także ich inaktywacji. Co więcej, 11 $\beta$ -HSD1 ulega również ekspresji w niektórych strukturach mózgowia takich jak hipokamp, kora mózgowa, prążkowie i przysadka mózgowa (Moisan i wsp., 1990), podczas gdy ekspresja 11 $\beta$ HSD2 w dorosłym mózgu jest ograniczona (Chen i wsp., 2014).



Rycina 2. Szlaki biosyntezy glikokortykosteroidów (Noti i wsp., 2009).

GK nie tylko wysyłają sygnały do komórek docelowych, ale również za pośrednictwem 2 typów receptorów: glikokortykoidowego (GR) oraz mineralokortykoidowego (MR), wpływają na hamowanie aktywności osi PPN poprzez sprzężenie zwrotne ujemne. W wyniku wiązania się GK do receptorów GR i MR zlokalizowanych w neuronach uwalniających kortykoliberynę CRF w podwzgórz, jak również i hipokampie, dochodzi do hamowania sekrecji ACTH z przedniego płata przysadki mózgowej. Dodatkowo, GK działają również lokalnie poprzez wiązanie się do GR w korze nadnerczy wyciszając dalszą syntezę GK w czasie nadmiernej aktywności osi PPN (Pérez i wsp., 2019).

### 3.2. Molekularne mechanizmy działania glikokortykosteroidów

Receptory GR oraz MR pochodzą od wspólnego przodka – receptora korynkoidowego. Powstały około 450 milionów lat temu w wyniku duplikacji i dywergencji jednego genu (Baker i Katsu, 2019). MR poza GK, wiąże się również z aldosteronem, dezoksykortykosteronem czy progesteronem. Natomiast GR, w toku ewolucji zyskał wysoką selektywność wobec GK. Z powodu dziesięciokrotnie niższego powinowactwa do GK, w porównaniu do MR, ekspresja GR zachodzi dopiero przy wzroście poziomu GK w odpowiedzi na stresor. Dlatego uważa się, że GR jest głównym mediatorem skutków warunków stresowych i mechanizmu ujemnego sprzężenia zwrotnego (de Kloet, 2022). Te dwa typy receptorów mają zróżnicowane rozmieszczenie w mózgowiu. MR ulega ekspresji m.in. w hipokampie, ciele migdałowatym i przegrodzie bocznej. GR natomiast powszechnie występuje m.in. w hipokampie i jądrze przyśrodkowym podwzgórza, gdzie rozpoczyna się aktywacja osi PPN (Lightman i wsp., 2020). Co ciekawe sugeruje się, że w mózgowiu GR i MR, które w swoim działaniu wzajemnie się uzupełniają, mogą regulować procesy neurochemiczne w tym: uwalnianie neurotransmiterów (glutaminianu, kwasu gamma-aminomasłowego; GABA), neuromodulatorów (serotoniny, dopaminy i noradrenaliny) (Gray i wsp., 2017), a także czynników neurotroficznych (neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego; BDNF) (Chiba i wsp., 2012).

Zarówno naturalne, jak i syntetyczne GK, wiążąc się z MR i GR pośredniczą w genomowych i szybkich, niegenomowych mechanizmach. Ze względu na swoje właściwości, GK mogą swobodnie przekraczać błonę komórkową i wiązać się również z cytoplazmatycznym receptorem MR i GR. Oba receptory, przemieszczając się do jądra komórkowego z cytoplazmy, działając, jako czynniki transkrypcyjne aktywowane ligandem. Dzięki tym mechanizmom wywierają odpowiedź komórki, poprzez wiązanie się z elementami genomowym i zmianę w ekspresji genów. Cytoplazmatyczne receptory GK występują w postaci wielobiałkowych kompleksów z towarzyszącymi białkami opiekuńczymi takimi jak: białka szoku cieplnego (Hsp90, Hsp70, Hsp40), p23 oraz FKBP5 (Gallo i wsp., 2007; Gray i wsp., 2017). Związanie się receptora z ligandem skutkuje odłączeniem się białek opiekuńczych, zmianą konformacji receptora i translokacją kompleksu ligand-receptor do jądra komórkowego (Rycina 1.) (Timmermans i wsp. 2019). Poprzez wiązanie się ze specyficznymi sekwencjami DNA

zwanymi elementami odpowiedzi na GK (GRE), kompleks ligand-receptor moduluje ekspresję genów, tym samym je hamując lub wzmacniając (Gray i wsp., 2017). Ponadto, GR mogą również regulować ekspresję genów poprzez interakcję z prozapalnymi czynnikami transkrypcyjnymi takimi jak: czynnik jądrowy kappa B (NF- $\kappa$ B) i białko aktywatorowe-1 (AP-1) (Kokkinopoulou i wsp., 2021).

GK mogą również wywierać wpływ na transkrypcję i inne czynności komórkowe poprzez mechanizmy niegenomowe za pośrednictwem specyficznych wiązań z błonowym receptorem GR i/lub MR i ich interakcję z receptorami sprzężonymi z białkiem G. Potwierdzono istnienie tych izoform w strukturach układu limbicznego, w tym w hipokampie (Karst i wsp., 2005). Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że receptory GK mogą bezpośrednio aktywować dalsze wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe i wpływać na funkcje mitochondriów (Morgan i wsp., 2016). Ponadto powodują aktywację szlaków sygnałowych kinaz: kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK), kinazy 3-fosfoinozytydu (PI3K) i kinazy białkowej B (Akt) (Panettieri i wsp., 2019). Na poziomie molekularnym receptory GK mogą modulować procesy zachodzące w mitochondriach. Mechanizm ten polega na translokacji GR do mitochondriów, gdzie regulują potencjał błonowy, ekspresję genów mitochondrialnych oraz akumulację wapnia (Psarra i Sekeris, 2011). Natomiast nie znaleziono dowodów potwierdzających obecność MR ani jego przemieszczania się do mitochondriów w neuronach (Du i wsp., 2009).

### **3.3. Allostaza i przeciążenie allostatyczne**

Reakcja stresowa ma fundamentalne znaczenie w ewolucji. Odpowiedź organizmu na stresor jest powszechna od prokariota po kręgowce, aby dostosować się do niedogodnych warunków środowiska (Taborsky i wsp., 2021). Allostazę definiuje się jako zbiór aktywnych procesów wymaganych do osiągnięcia stabilności zewnętrznej i wewnętrznej, prowadzącym do adaptacji systemów fizjologicznych do wyzwań środowiskowych, fizycznych i psychospołecznych. Koncepcja ta kładzie nacisk na elastyczne procesy adaptacyjne do szybko zmieniającego się środowiska, poprzez zmianę środowiska wewnętrznego ustroju i przystosowania się do bieżących warunków, w celu wspierania organizmu (Logan i Barksdale, 2008). Przewlekłą ekspozycję na czynniki szkodliwe, dr Hans Selye nazwał zespołem ogólnej adaptacji i podzielił go na trzy etapy: fazę alarmową, fazę oporu i fazę wyczerpania (Selye, 1936). Teoria ta zakłada, że reakcja

stresowa pełni rolę adaptacyjną, jednakże, gdy substraty reakcji zostaną wyczerpane, organizm staje się podatny na uszkodzenia i dysfunkcje. Następstwem zespołu ogólnej adaptacji jest obecna hipoteza oparta o GK (McEwen i Sapolsky, 1995). Przyzwyczajenie osi PPN do ciągłego obrotu GK w odpowiedzi na stresor zapewnia organizmowi przewagę poprzez optymalizację zasobów energetycznych i przeciwdziałanie rozregulowaniu procesów kontroli poziomu GK. Szczególnie zapotrzebowanie na energię, również w procesie adaptacji, ma tkanka mózgowa, która niezbędna jest do przeżycia i reorganizacji neuronalnej (McEwen, 2018).

Do behawioralnych efektów adaptacji należą: zwiększona czujność, pobudzenie, wzrost funkcji poznawczych. Natomiast fizjologiczne skutki adaptacji obejmują mechanizmy związane z przekierowaniem energii: przyspieszenie akcji serca, aktywacja procesów metabolicznych takich jak lipoliza i glukoneogeneza, aby dostarczyć substraty energetyczne niezbędne do odpowiedniego funkcjonowania mózgu (Magomedova i Cummins, 2015). Ponadto wyciszenie funkcji wegetatywnych (reprodukcja, laktacja), hamowanie trawienia, modulacja odporności. Proces adaptacji na stresor jest zależny od wielu czynników, takich jak uwarunkowania genetyczne, środowiskowe oraz rozwojowe. Jednakże pod wpływem przedłużającego się i/lub wzrostu siły stresora odpowiedź adaptacyjna maleje. Co więcej, może to mieć szkodliwy wpływ na funkcje fizjologiczne m.in. metabolizm, wzrost, reprodukcję, odporność oraz zachowanie/ rozwój osobowości i ostatecznie rozwój chorób (Tsigos i wsp., 2000).

Przedłużający się stres bądź brak możliwości osiągnięcia równowagi ustroju może doprowadzić do przeciążenia allostatycznego. Zjawisko to może wystąpić wskutek powtarzającego się stresu, powtarzanego bodźcowania wieloma stresorami, zaburzeń w adaptacji oraz przedłużonej reakcji stresowej (McEwen i Gianaros, 2011). Przeciążenie allostatyczne skutkuje utratą zdolności reagowania na stresor poprzez utratę plastyczności ustroju (McEwen, 1998). Skutki tego procesu obejmują wiele dolegliwości i typowych chorób cywilizacyjnych. Jednak w naturze przeciążenie allostatyczne ma na celu wywołanie korzystnych efektów np. magazynowania tłuszczu i przygotowania organizmu do hibernacji (McEwen i Wingfield, 2007).

Co więcej przedłużający się stres, w sposób zależny od rodzaju stresora, czasu jego trwania, intensywności, wieku i płci, może wpływać na procesy pamięciowe (El Marzouki i wsp., 2021). W badaniach *in vivo* przeciążenie allostatyczne powoduje

atrofię hipokampa, kory przedczołowej oraz przerost ciała migdałowatego (McEwen i Chattarji, 2004). Upośledzając tym samym procesy funkcji kognitywnych.

### **3.4. Ekspozycja na zimno**

Czynniki środowiskowe, między innymi zmiany temperatur mają istotny wpływ na odpowiedź organizmu. Ośrodkowy układ nerwowy reguluje równowagę energetyczną, utrzymanie temperatury ciała i termogenezę w odpowiedzi na stres związany z zimnem (Castellani i Young, 2016). Poprzez aktywację ośrodka regulacji temperatury w podwzgórzcu, aktywacji osi PPN oraz układu miejsc sinawe-norepinefryna, zachodzi szereg procesów regulujących odpowiedź organizmu na stres związany z zimnem (Chrousos, 2009; Hu i wsp., 2022). Udowodniono, że zarówno krótkotrwała, jak i długotrwała ekspozycja na zimno powoduje wzrost aktywacji osi PPN a w konsekwencji wyrzut kortykosteronu do krwiobiegu gryzoni (Feng i wsp., 2021; El Marzouki i wsp., 2021).

Podobnie jak większość stresorów, tak i ekspozycja na zimno (zanurzenie w zimnej wodzie), stanowi dla ustroju wyzwanie o charakterze fizjologicznym na wielu poziomach. Aby organizm dostosował się do otaczającego środowiska, musi zachować odpowiednią temperaturę mózgu oraz innych narządów wewnętrznych poprzez właściwe kontrolowanie procesów generowania i utraty ciepła (Espeland, 2022). Procesy te zachodzą, poprzez zwężenie naczyń obwodowych, aktywację bogatej w mitochondria brunatnej tkanki tłuszczowej (BAT) oraz brunatnienie podskórnej tkanki tłuszczowej. Aktywacja BAT wyzwalana jest przez współczulny układ nerwowy. Uwalniana z zakończeń nerwowych, norepinefryna stymuluje receptor beta 3-adrenergiczny, aby umożliwić generowanie ciepła i katabolizowanie energii przez BAT (Cannon i Nedergaard, 2004; Stojanović i wsp., 2018).

Szczególnie wrażliwe na zimno, gryzonie, szybciej tracą ciepło i potrzebują więcej energii do utrzymania optymalnej temperatury ciała. Z tego względu mogą również rozwijać pewne cechy adaptacyjne. Zwierzęta hodowane w środowisku o obniżonych temperaturach wykazywały zmiany fenotypowe takie jak: krótsze uszy i ogony, dłuższe futro, większe narządy wewnętrzne: nerki, wątroba oraz większą masę BAT (Hankenson i wsp., 2018). Termogeneza jest podstawowym mechanizmem adaptacyjnym i pojawia się przy spadku temperatury otoczenia. W procesie tym kluczową rolę odgrywa BAT

o wysokiej zdolności oksydacyjnej. Długotrwanie obniżona temperatura powoduje zwiększoną aktywność mitochondriów i indukcję utleniania kwasów tłuszczowych (Yau i wsp., 2021).

Podczas zanurzenia w zimnej wodzie organizm wykazuje dwie różne odpowiedzi autonomiczne, reaguje zarówno na reakcję na nurkowanie i szok zimna. Pierwsza reakcja aktywowana jest przez zwilżenie i ochłodzenie twarzy podczas wstrzymywania oddechu. Skutkuje to bradykardią rytmu zatokowego, wazokonstrykcją naczyń obwodowych i uwolnieniem erytrocytów zmagazynowanych w śledzionie (Lindholm i Lundgren, 2009). Reakcja na szok zimna spowodowana jest przez aktywację skórnych termoreceptorów, które inicjują sekwencję odpowiedzi fizjologicznej. Obejmują one tachykardię współczulną, nadmierną hiperwentylację, zwężenie naczyń obwodowych, wzrost ciśnienia krwi i zmniejszenie perfuzji krwi w mózgu (Shattock i Tipton, 2012).

W celu zastosowania modelu ostrego stresu w badaniach *in vivo* wykorzystuje się jednorazową ekspozycję na zimno, natomiast by wywołać przewlekłą reakcję stresową stosuje się wielokrotną i powtarzaną ekspozycję (Atrooz i wsp., 2021). Spowodowany ekspozycją ustroju na niskie temperatury, stres zimna może prowadzić do szeregu nieprawidłowości na poziomie behawioru (Sturman i wsp., 2018), emocji, układu neuroendokrynnego (Xu i wsp., 2019a), odporności (Lian i wsp. 2017) oraz metabolizmu energetycznego (Liu i wsp., 2019; Shi i wsp., 2019). Ponadto stres wywołany zimnem może wpływać niekorzystnie na układ sercowo-naczyniowy, a także może nieść szczególnie negatywne konsekwencje na funkcjonowanie mózgu, obniżając m.in. funkcje poznawcze (El Marzouki i wsp., 2021). Ostatnio wyniki badań wykazały, że ekspozycja na zimno w tkance hipokampa może indukować stres oksydacyjny wywołany przez kortykosteroidy i aktywować szlak apoptotyczny w neuronach (Xu i wsp., 2019a).

Mimo, że narażenie organizmu na niskie temperatury środowiska jest powszechnym stresorem to może przynieść wiele korzyści zdrowotnych. Szereg badań sugeruje, że kąpiele w zimnej wodzie obniżają zaburzenia nastroju (van Tulleken i wsp., 2018), wpierają funkcje endokryne (Gundle i Atkinson, 2020), układ odpornościowy (Lubkowska i wsp., 2013) i poprawiają parametry hematologiczne (Chęcinska-Maciejewska i wsp., 2019).

Tematyka wpływu regularnych kąpielí w zimnej wodzie na układ nerwowy nadal pozostaje niejasna i wymaga dalszych badań w celu pełnego zrozumienia tego zjawiska. Wiadomo jednak, że na poziomie molekularnym w stanie ekspozycji na zimno następuje zwiększona synteza niektórych białek, między innymi białko wiążące kwas rybonukleinowy 3 (RBM3), nazywanego białkiem szoku zimna (Xia i wsp., 2018). RBM3 uczestniczy w regulacji czynności fizjologicznych na poziomie komórkowym w warunkach stresu spowodowanego nie tylko zimnem, ale również niedotlenieniem czy promieniowaniem ultrafioletowym (Wellmann i wsp., 2004). Ponadto RBM3 pełni istotną funkcję w transkrypcji i translacji, biogenezie mikroRNA, rytmie dobowym, cyklu komórkowym, odporności, kancerogenezie, apoptozie i neuroprotekcji (Danno i wsp., 2000; Jögi i wsp., 2009; Lin i wsp., 2023; Ma i wsp., 2018; Sureban i wsp., 2008). Stwierdzono, że RBM3 wykazuje działanie wspomagające przyrost mięśni szkieletowych oraz wpływa na mechanizmy antyatroficzne w modelu *in vitro* i *in vivo* (Van Pelt i wsp., 2018). Co więcej, w stanie łagodnej hipotermii zwiększa fosforylację Akt, które reguluje procesy metaboliczne i wchłanianie glukozy, wpływając na przeżycie komórek (Yang Liu i wsp., 2021). Mimo, że mechanizm cytoprotekcyjnego działania RBM3 nie jest w pełni poznany pojawia się coraz więcej badań związanych z wpływem tego białka na ośrodkowy układ nerwowy. Wykazano, że RBM3 zapobiega utracie neuronów oraz pełni istotną rolę w regeneracji synaps po ochłodzeniu w modelu choroby Alzheimera (Peretti i wsp., 2015). Ponadto u gryzoni z niedokrwinnym uszkodzeniem mózgu powoduje stymulację neurogenezy (Zhu i wsp., 2019).

Badania związane z przewlekłą ekspozycją na zimno nie są jednak jednoznaczne. Jedne sugerują związek z mechanizmami adaptacyjnymi osi PPN i/lub brakiem wpływu na procesy pamięciowe (El Marzouki i wsp., 2021), inne, że ekspozycja na zimno wydaje się być silnym stresorem. Wykazano, że długotrwały stres wywołany ekspozycją na zimno powoduje neurozapalenie indukowane aktywacją mikrogleju i uszkodzenie neuronów hipokampu (Lang i wsp., 2020). Co więcej w innych badaniach stwierdzono, że powoduje utratę neuronów w regionach CA1 i CA3 (Xu i wsp., 2019). Stres wywołany zimnem może również determinować wzrost RBM3 przy jednoczesnym obniżeniu poziomu neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) w hipokampie szczurów (Lian i wsp., 2018).

### 3.5. Glikokortykosteroidy w medycynie

GK są szeroko stosowane w medycynie w postaci leków wykazujących silne i długotrwałe działanie przeciwbólowe i immunosupresyjne. Należą do nich m.in. hydrokortyzon, octan kortyzolu, prednizon, prednizolon i fludrokortyzon (Tabela 1.). Jednym z przykładów syntetycznych GK jest również deksametazon (DEXA), fluorowany steroid, który od 1977 roku znajduje się na modelowej liście leków podstawowych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO). DEXA jest dostępny w różnych preparatach i różnych dawkach (tabletki 0,5 mg – 6 mg). Jednak stosowany jest również jako zawiesina iniekcyjna czy roztwór doustny (Eckhard i wsp., 2019). W zależności od stanu chorobowego stosuje się jego dawkowanie od 0,75-9 mg/ dobę w leczeniu stanów zapalnych lub silnych reakcji alergicznych, do 30-40 mg/ dobę w przypadku stwardnienia rozsianego i innych jednostek chorobowych (Johnson i wsp., 2023). Ze względu na swoją strukturę chemiczną, DEXA wykazuje działanie 35 razy silniejsze niż kortyzon, natomiast nie wykazano jego aktywności mineralokortykosteroidowej. Uwzględniając właściwości farmakodynamiczne, biologiczny okres półtrwania DEXA wynosi 36-54 godziny. Natomiast jego średni okres półtrwania w osoczu wynosi około 4 godziny (Johnson i Lopez, 2023). DEXA łatwo przenika przez barierę krew-mózg, łożysko, jak również do kobiecego mleka (Dubashynskaya i wsp., 2021). Ten syntetyczny GK metabolizowany jest przez cytochrom P450 3A4 (CYP3A4) głównie w wątrobie i wydalany z żółcią i w formie niezmienionej z moczem (Johnson i wsp., 2023). DEXA wiążąc się z GR podlega procesom wewnątrzkomórkowym, podobnie jak naturalne GK. Efekty mechanizmów niegenomowych występują w przeciągu pierwszych kilku minut po przyjęciu leku, poprzez receptory błonowe, natomiast działania na poziomie genomu rozpoczynane są po związaniu z receptorem cytoplazmatycznym (Buttgereit, 2002). Efektami działania DEXA jest modulowanie syntezy cytokin prozapalnych (interleukiny-1, interleukiny-6), czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- $\alpha$ ) a także cyklooksygenazy-2, syntazy tlenku azotu-2 czy cząsteczek adhezji komórkowej poprzez blokowanie NF- $\kappa$ B. Ostatecznie mechanizmy te powodują hamowanie odporności komórkowej, w której pośredniczą składowe układu białokrwinkowego m.in. limfocyty, makrofagi, monocyty, bazofile (Hardy i wsp., 2020).



Tabela 1. Porównanie syntetycznych glikokortykosteroidów po podaniu doustnym (Baid i Nieman, 2006).

| Nazwa                  | Biologiczny okres półtrwania (godz.) | Względna siła działania | Fizjologiczna dawka zastępcza u dorosłych (mg) |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------------|--|
| <b>Deksametazon</b>    | 36-54                                | 25-50                   | 0,5  |
| <b>Fludrokortyzon</b>  | 18-36                                | 15                      | 0,005-0,2                                      |
| <b>Hydrokortyzon</b>   | 8-12                                 | 1                       | 20   |
| <b>Octan kortyzolu</b> | 8-12                                 | 0,8                     | 25   |
| <b>Prednizolon</b>     | 18-36                                | 4                       | 5  |
| <b>Prednizon</b>       | 18-36                                | 4                       | 5  |

Ze względu na swoje właściwości DEXA jest powszechnie stosowany m.in. w zapobieganiu wymiotom, podtrzymaniu ciąży, wyciszaniu silnych reakcji alergicznych, w terapii zespołu ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej, w terapii chorób autoimmunizacyjnych, po zabiegach operacyjnych oraz podczas chemioterapii. Ponadto jest wykorzystywany w leczeniu wstrząsów, atopowego zapalenia skóry, stwardnienia rozsianego i obrzęku mózgu (Johnson i wsp., 2023). Jednak zarówno krótkotrwałe, jak i przewlekłe stosowanie DEXA niesie za sobą wiele działań niepożądanych. Długotrwałe przyjmowanie może prowadzić do rozwoju zaćmy, jaskry, obniżenia odporności, cukrzycy, kwasicy metabolicznej, osteoporozy, zapalenia trzustki, zahamowania wzrostu oraz wpływać na zaburzenia nastroju, deprivację snu, rozwój depresji i anoreksji (Warrington i Bostwick, 2006).

W badaniach *in vitro* wykazano, że 3 dniowe traktowanie DEXA (5  $\mu$ M) pierwotnych neuronów hipokampalnych może promować ich degenerację poprzez wzrost ekspresji białek prozapalnych (NLRP-1, kaspazy-1, interleukiny-1 $\beta$ ) i obniżenie ekspresji GR (Zhang i wsp., 2017). Ponadto wykazano, że już prenatalna ekspozycja na DEXA może wpływać na upośledzenie rozwoju kory mózgowej oraz zmniejszenie złożoności neuronów w korze przedczołowej i zakręcie zębatym hipokampa (Tsiarli i wsp., 2017). Wykazano także, że traktowanie DEXA osobników we wczesnym okresie życia powoduje zmiany plastyczności synaptycznej w hipokampie i zakłóca konsolidację pamięci (Lin i wsp., 2006; Wang i wsp., 2010). Jednak, nie wszystkie badania potwierdzają negatywne skutki działania, niektóre z prac wykazują, że w zależności od

wieku, pojedyncza 0,5 mg dawka DEXA po urodzeniu może powodować wzrost gęstości dendrytycznej, zwiększać przeżywalność i neurogenezę w zakręcie zębatym (Tsai i wsp., 2016). Z kolei badania na myszach dorosłych wykazują, że podanie 50 mg DEXA zmniejsza nabywanie pamięci awersyjnej w warunkowaniu strach na kontekst, zmniejsza zdolności poznawcze poprzez obniżenie aktywności neuronów (dos Santos i wsp., 2019). Co więcej, 8 tygodniowe traktowanie DEXA samic szczurów zwiększa zachowania depresyjne (Mori i wsp., 2022). Negatywny wpływ DEXA na funkcjonowanie całego organizmu, w tym mózgu porównywane są do skutków długotrwałego stresu. Dlatego w badaniach *in vivo*, traktowanie DEXA stosuje się jako model przewlekłego stresu (Mori i wsp., 2022).

### 3.6. Hipokamp

Hipokamp jest strukturą mózgu należącą do układu limbicznego. Odgrywa istotną rolę w zapamiętywaniu, uczeniu się i nawigacji przestrzennej. Należy do najbardziej plastycznych obszarów mózgu. Pojęcie „hipokamp” wywodzi się z greckiego słowa *hippocampus* oznaczającego konika morskiego i odnosi się do charakterystycznej budowy tej struktury mózgowia. Pod względem morfologicznym, hipokamp możemy podzielić na 3 części: głowę, tułów i ogon, przy czym głowa hipokampu jest odcinkiem rozszerzonym, natomiast ogon – cienkim i zakrzywionym (Fogwe, 2023). Ludzki hipokamp położony jest w przyśrodkowym płacie skroniowym, natomiast hipokamp gryzoni leży pod korą nową (Knierim, 2015). Histologicznie możemy, również podzielić hipokamp na obszary *Cornu Ammonis* 1-3 (CA1-3) oraz zakręt zębaty, gdzie aktywnie zachodzi neurogeneza również u osobników dorosłych (Fogwe i wsp., 2023). Obszar CA1 odgrywa istotną rolę w dopasowywaniu informacji uzyskanych z CA3 i zawiera głównie neurony piramidowe. CA2 jest to mały obszar hipokampu znajdujący się między CA1 i CA3. Charakteryzuje się stosunkowo wysoką odpornością na uszkodzenia spowodowane urazami, stabilnością plastyczności synaptycznej (Zhao i wsp., 2007) i sprawuje istotną funkcję w tworzeniu pamięci socjalnej (Hitti i Siegelbaum, 2014). Obszar CA3, również bogaty w komórki piramidalne, jest niezwykle ważny w funkcji kodowania, przechowywania i odzyskiwania pamięci (Senzai, 2019). Ze względu na sąsiadujące położenie z ciałem migdałowatym odgrywa również istotną rolę w przywoływaniu i regulowaniu pamięci emocjonalnej (Schumacher i wsp., 2018).

Hipokamp wykazuje zdolności do tworzenia nowych neuronów oraz plastyczności synaptycznej, stanowiąc najbardziej plastyczną strukturę mózgu. Proces neurogenezy jest silnie regulowany przez czynniki środowiskowe (długotrwały stres, aktywności fizyczna, dieta) i wewnątrzkomórkowe (m.in. czynniki neurotroficzne, neuroprzekazniki) (Jurkowski i wsp., 2020). Mechanizm ten może być indukowany poprzez aktywność insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), czynnika wzrostu fibroblastów-2 (FGF-2), czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), jak również BDNF.

### **3.6.1. Neuroprotecyjne szlaki sygnałowe w hipokampie**

Do białek wywierających działanie ochronne i regeneracyjne poprzez stymulację proliferacji, różnicowania, wzrostu, prawidłowego funkcjonowania i przeżycia komórek neuronalnych należą neurotrofiny. Białka te są wydzielane przez wiele typów komórek, takich jak nerwowe komórki macierzyste, neurony, oligodendrocyty, astrocyty i mikroglej. Do rodziny neurotrofin należą neurotrofina 3, rzęskowy czynnik neurotroficzny, neurotroficzny czynnik pochodzenia glejowego, czynnik wzrostu nerwów oraz BDNF (Huang i Reichardt, 2001; Lu i wsp., 2003; Shirazi i wsp., 2015; Traiffort i wsp., 2020).

BDNF jest jednym z najlepiej zbadanych i dokładnie opisanych neurotrofin. Głównym obszarem, w którym jest rozpowszechniony, jest centralny układ nerwowy. Choć również obecny jest w komórkach nieneuronalnych, takich jak kardiomiocyty (Li i wsp., 2022), miocyty mięśni szkieletowych (Ahuja i wsp., 2022), nabłonek pęcherzykowy płuc (Paris i wsp., 2020), leukocyty (Anders i wsp., 2020) i płytki krwi (Amadio i wsp., 2017). W centralnym układzie nerwowym, BDNF najczęściej obserwowany jest w strukturach takich jak hipokamp oraz kora mózgowa. Dodatkowo, stwierdza się jego obecność w prążkowiu, mózdzku oraz polu brzusznej nakrywki (Conner i wsp., 1997). Ścieżki sygnałowe związane z BDNF regulują wiele mechanizmów wewnątrzkomórkowych umożliwiających regulację proliferacji, indukcję przeżycia i różnicowanie neuronów w hipokampie (Baptista i Irade, 2018). Ponadto zaangażowane są w rozwój dendrytów, formowanie synaps, plastyczność synaptyczną oraz regulowanie apoptozy (Miria i wsp., 2019; Sonoyama i wsp., 2020).

Z uwagi na zdolność BDNF do przekraczania BBB, sugeruje się, że jego stężenie w osoczu koreluje z jego stężeniem w mózgowiu (Hyman i wsp., 1994). Wykazano, że

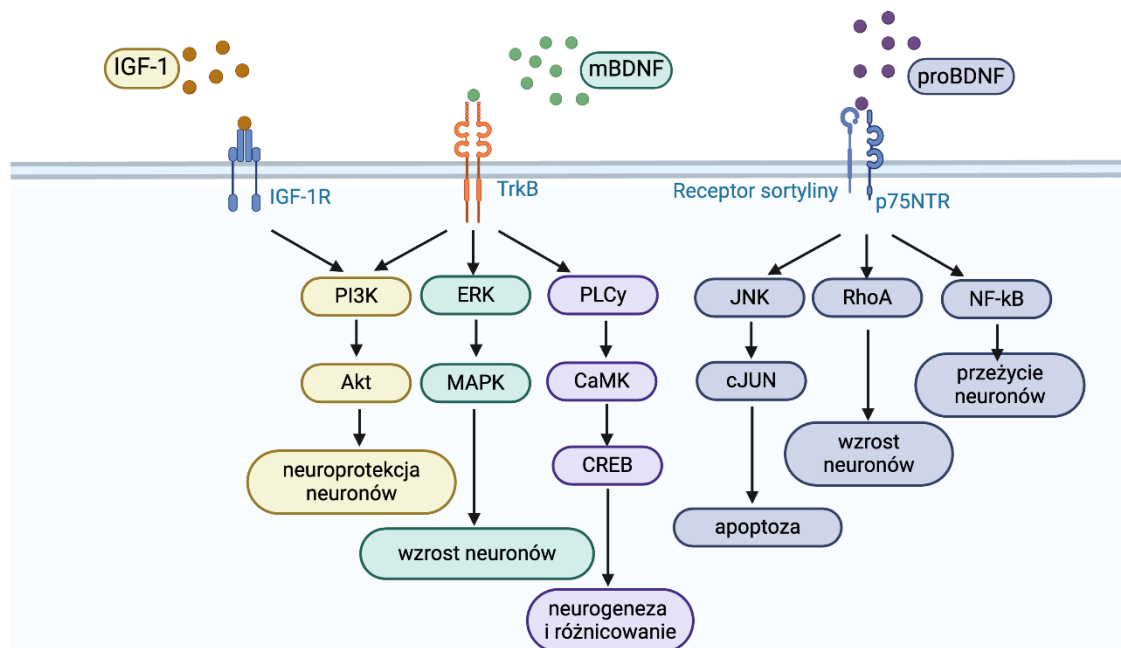
wzrost poziomu BDNF poprawia pamięć i zdolność przestrzennego uczenia się (Mu i wsp., 1999; Quesseveur i wsp., 2013). Obniżony poziom BDNF obserwowany jest w zaburzeniach psychicznych takich jak depresja, w chorobach neurodegeneracyjnych (Azman i Zakaria, 2022; Shimizu i wsp., 2003), jak również związany jest z obniżeniem objętości hipokampa (Fujii i wsp., 2022). Ponadto, uważa się, że BDNF wywiera działanie antydepresyjne w korze przedczołowej i hipokampie (Deyama i Kaneda, 2020; Shirayama i wsp., 2002). Co więcej, odgrywa neuroprotekcijną rolę w chorobie Alzheimera, chorobie Huntingtona, chorobie Parkinsona, stwardnieniu zanikowym bocznym i chorobach neurologicznych takich jak stwardnienie rozsiane oraz udar (Allen i wsp., 2013; Lee i wsp., 2012; Liu i wsp., 2020).

BDNF syntetyzowany jest ze swojej formy prekursorowej (pre-proBDNF) na poziomie retikulum endoplazmatycznego a następnie przekształcony do proBDNF. ProBDNF może indukować procesy apoptotyczne i zmniejszać kolce dendrytyczne. Za pośrednictwem receptora p75NTR zakotwiczonego w błonie komórkowej, proBDNF może promować apoptozę komórek, ale również ich przeżycie i różnicowanie (Ahmad i wsp., 2014). Ponadto proBDNF może zostać przekształcony do formy dojrzałej (mBDNF) przez endoproteazy subtylizyno-keksynowe w sieci *trans* aparatu Golgiego. mBDNF może również powstawać przez reakcję z udziałem proBDNF katalizowaną przez konwertazy w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych lub pozakomórkowo przez plazminę i metaloproteazy macierzy. mBDNF poprzez wiązanie się z receptorem kinazy tropomiozyny B (TrkB) podlega dimeryzacji i autofosforyzacji. W wyniku tego procesu promuje szlaki wewnątrzkomórkowe. Poprzez powstawanie kompleksów pTrkB (Rycina 3.):

- z kinazą 3-fosfoinozytydu (PI3K) i Akt promuje przeżycie neuronów;
- z kinazą białkową aktywowaną mitogenem (MAPK) i kinazami białkowymi regulowanymi pozakomórkowo (ERK) wpływa na wzrost neuronów;
- z fosfolipazą C-gamma (PLC $\gamma$ ) i kinazą białkową zależną od wapnia (CaMK) promuje plastyczność synaptyczną, ale również poprzez indukcję białka wiążącego element odpowiedzi cAMP (CREB), wspiera neurogenezę i różnicowanie się komórek (Schirò i wsp. 2022).

Poziom proBDNF i mBDNF może się różnić w poszczególnych strukturach mózgu i zmieniać w przebiegu ontogenezy. W czasie rozwoju obserwowany jest podwyższony

poziom proBDNF, natomiast w okresie dojrzałości to mBDNF sprzyja neuroprotekcji i plastyczności synaptycznej (Je i wsp., 2012; Rauskolb i wsp., 2010; Yeh i wsp., 2012). Neuroprotekcyny wpływ BDNF związany jest z aktywacją szlaku TrkB/MAPK/ERK oraz TrkB/IP3K/Akt prowadząc do hamowania mechanizmów proapoptotycznych oraz uszkodzeń związanych ze stresem oksydacyjnym (Numakawa i wsp. 2010).



Rycina 3. Schemat szlaków sygnałowych IGF-1, proBDNF i mBDNF w metabolizmie neuronalnym. **Skróty:** IGF-1, insulinopodobny czynnik wzrostu-1; IGF-1R, receptor kinazy tyrozynowej insulinopodobnego czynnika wzrostu-1; mBDNF, forma dojrzała neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego; proBDNF, forma pro- neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego; TrkB, kinaza receptora tropomiozyny B; p75NTR, receptor neurotrofiny p75; PI3K, kinaza 3-fosfoinozytydu; ERK, kinaza białkowa regulowana pozakomórkowo; PLC $\gamma$ , fosfolipaza C-gamma; Akt, kinaza serynowo-treoninowa; MAPK, kinaza białkowa aktywowana mitogenem; CaMK, kinaza białkowa zależna od wapnia; CREB, białko wiążące element odpowiedzi cAMP; JNK, kinaza białka cJUN; RhoA, kinaza związana z Rho; NF- $\kappa$ B, czynnik jądrowy kappa B. Opracowanie własne na podstawie Ge i wsp., 2022; Li i wsp., 2022.

Do białek wpływających na aktywację kaskady sygnalizacji mechanizmów neuroprotekcyjnych należy również insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1). Białko to zostało odkryte w 1957 roku przez Salmona i Daughday'a (Salmon i Daughday, 1957). Jest ono jednołańcuchowym polipeptydem o masie cząsteczkowej

7,6 kDa, składającym się z 70 aminokwasów połączonych trzema parami wiązań disiarczkowych. IGF-1 syntetyzowany jest w wątrobie w odpowiedzi na wydzielany hormon wzrostu przez przysadkę mózgową. Białko to może być również syntetyzowane lokalnie, np. w ośrodkowym układzie nerwowym, szczególnie w korze mózgowej, podwzgórzu, hipokampie i mózdzku (Nishijima i wsp., 2010; Yuan i wsp., 2021). Poziom tego białka osiąga maksimum w okresie okołoporodowym i maleje w trakcie życia. Jednakże IGF-1 może być utrzymywany na stałym poziomie w obszarach mózgu związanych z ciągłą odnową i przebudową (Bondy i wsp., 1992).

Stwierdzono, że IGF-1 wykazuje działanie plejotropowe we wszystkich rodzajach komórek nerwowych (neurony, astrocyty, oligodendrocyty). Wpływa między innymi na ich proliferację, promuje dojrzewanie i mielinizację (Aghanoori i wsp., 2022; Chattopadhyay i Shubayev, 2009). IGF-1, jako istoty czynnik neurotroficzny, wpływa również na neuroplastyczność, metabolizm i regenerację neuronów w odpowiedzi zmiany zachodzące w OUN w procesie uczenia i tworzenia pamięci (Bianchi i wsp., 2017; Dyer i wsp., 2016).

Początkowo IGF-1, zarówno w krwioobiegu jak i w tkankach, wiąże się z własnym białkiem wiążącym (IGFBP). Następnie łączy się ze specyficznym receptorem kinazy tyrozynowej (IGF-1R), ale również może wiązać się z receptorem insulinowym. Następstwem tego jest aktywacja szlaków Ras/Raf/MAPK oraz PI3K/Akt/mTOR, przyczyniających się do przeżycia neuronów i poprawy ich funkcjonowania. Poprzez aktywowanie szlaku PI3K/Akt, IGF-1 może regulować neuronalne mechanizmy ochronne przed apoptozą indukowaną stresem oksydacyjnym (Hallak i wsp., 2001) (Rycina 3.). Uważa się, że obniżenie poziomu tego białka może skutkować zwiększoną odpornością na stres oksydacyjny i łagodnej dysfunkcji mitochondriów, co może prowadzić do hormezy (Troulinaki i Bano, 2012).

### **3.6.2. Wpływ glikokortykosteroidów na hipokamp**

Podczas przewlekłego stresu dochodzi do nadaktywności osi PPN i hipersekcji GK. Proces ten ma szkodliwy wpływ na funkcje układu immunologicznego, sercowo-naczyniowego, funkcje metaboliczne i neuronalne (Janssen, 2022; de Kloet i wsp., 2008; de Kloet i wsp., 2005). Wykazano, że przewlekły stres może powodować nasilenie utraty neuronów i rozwój wtórnej neurodegeneracji (Jones i wsp.,

2015). Ponadto stwierdzono, że długotrwały stres powoduje obniżenie objętości hipokampa (Rahman i wsp., 2016). Hipokamp jako kluczowy element regulacji reakcji stresowej, jest szczególnie narażony na uszkodzenia. Podwyższona aktywność receptorów GR i MR hamuje uwalnianie GK a w następstwie powoduje zaburzenia funkcjonowania hipokampa i deregulację osi PPN (Levone i wsp., 2015). MR i GR regulują wiele procesów związanych z różnicowaniem i pobudliwością neuronów, a także regulują reaktywność behawioralną, nastrój oraz funkcje poznawcze. MR niezbędny jest w procesie oceny i przywracania pamięci, aktywowany jest podczas wczesnej fazy stresu, natomiast aktywacja GR kluczowa jest w konsolidacji pamięci i adaptacji behawioralnej (Koning i wsp., 2019).

Wykazano, że aktywność receptorów GR i MR jest powiązana z podatnością na zaburzenia i choroby związane ze stresem takie jak depresja i zespół stresu pourazowego (Tertil i wsp., 2018). Ponadto sugeruje się, że przewlekła ekspozycja na GK znacząco zmniejsza objętość hipokampa oraz obniża jego neurogenezę i plastyczność synaptyczną w hipokampie (Schoenfeld i wsp., 2017). Co więcej, powoduje obniżenie przeżywalności już wykształtowanych neuronów oraz istotnie zmniejsza objętość zakrętu zębatego hipokampu, a zmiany te są skorelowane z upośledzeniem funkcji poznawczych (Naninck i wsp., 2015). W warunkach przewlekłego stresu znacznemu obniżeniu ulega poziom BDNF, który jest istotnym elementem regulacji funkcji poznawczych i prawidłowego funkcjonowania centralnego układu nerwowego. Wykazano, że stres może przyczynić się do zaburzeń behawioralnych, takich jak zachowania lękowe i depresyjne, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt (Azarfarin i wsp., 2018; García-Bueno i wsp., 2008). Potwierdzono, że długotrwały stres skutkuje modyfikacjami w strukturze mózgu gryzoni. Nadmierna ekspozycja na stresory powoduje zmniejszenie neurogenezy w zakręcie zębatym hipokampu, retrakcje dendrytów w neuronach hipokampalnych w regionie CA3 (Schoenfeld i wsp., 2017) oraz przerost neuronów w ciele migdałowatym (Eili i wsp., 2012). Ponadto będąc częścią brzusznej pętli prążkowiej, hipokamp może oddziaływać na zachowania motoryczne (Molnár, 2011). Podejrzewa się, że obniżenie objętości hipokampa może być wynikiem interakcji tej struktury z podwzgórzem, co potencjalnie wpływa na uwalnianie ACTH. Wskutek tego w atrofii hipokampa stwierdza się wzrost poziomu GK (Koehl i Abrous, 2011).

Obniżenie objętości hipokampa jest charakterystyczne dla niektórych chorób neurodegeneracyjnych i psychicznych. Nieswoistym markerem procesów neurodegeneracyjnych i biomarkerem uszkodzenia aksonów jest białko łańcucha lekkiego neurofilamentu (NFL) oznaczane w osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym.

NFL jest jedną z izoform neurofilamentu, heteropolimeru specyficznego dla dojrzałych neuronów. W zależności od masy cząsteczkowej, neurofilamenty są klasyfikowane na trzy kategorie: lekkie (NFL) o masie 68 kilodaltonów (kDa), średnie (NFM) o masie 150 kDa oraz ciężkie (NFH) o masie 190-210 kDa. NFL jest istotną składową cytoszkieletu. Tworzy rdzeń struktury i dimeryzuje z NFH, bądź NFM, co prowadzi do powstania tetramerów, protofilamentów i ostatecznie włókien o średnicy około 10 nm (Khalil i wsp., 2018; Lee i wsp., 1993).

Neurofilamenty znajdują się głównie w zmielinizowanych aksonach i odgrywają ważną rolę w ich utrzymaniu, wsparciu wzrostu i przekazywania impulsów elektrycznych (Yuan i wsp., 2017). NFL jest najbardziej rozpowszechnioną izoformą i dobrze rozpuszczalną w płynach biologicznych. W wyniku uszkodzenia lub zwyrodnienia aksonów, poziom NFL wzrasta, najpierw w płynie mózgowo-rdzeniowym, a następnie we krwi (Coppens i wsp., 2023; Gaetani i wsp., 2019). Marker ten jest często stosowany w celu diagnostycznych stanów neurodegeneracyjnych (choroba Parkinsona, choroba Alzheimera), stwardnieniu rozsianym, udaru czy urazowym uszkodzeniu mózgu (Gaetani i wsp., 2019).

### **3.7. Mitochondria**

Około 1,5 miliarda lat temu doszło do zespolenia komórek, w którym archeową bakterię wchłonęła komórka gospodarza. W wyniku tego wydarzenia archeową bakterię poddano ewolucyjnemu procesowi przekształcenia w organelum komórkowe (Dyall i wsp., 2004).

Struktury te, określane mianem „elektrowni” komórkowych, zbudowane są z podwójnej błony oraz przestrzeni międzybłonowej. Zewnętrzna błona mitochondrialna pełni rolę w oddzielaniu wnętrza mitochondrium od cytozolu, umożliwiając przepływ małych cząsteczek, podczas gdy wewnętrzna błona mitochondrialna zawiera białka zaangażowane w syntezę ATP i tworzy grzebienie (*crisetae*) zwiększające powierzchnię dla procesów metabolicznych (Chan, 2020). Co więcej, mitochondria są jedynymi



organellami komórkowymi zawierającymi własny genom. Geny mitochondrialnego DNA (mtDNA) kodują m.in. 13 białek istotnych dla łańcucha oddechowego, procesu kluczowego w mitochondrialnym metabolizmie energetycznym (Wallace, 2015). Organelle te są niezwykle dynamiczne pod względem fuzji, rozszczepiania, a także mitofagii. W procesy te są zaangażowane mechanizmy zarówno fizjologiczne jak i regulacje metaboliczne komórki m.in. homeostaza wapnia, apoptoza, autofagia, czy sygnalizacja redoks (Tilokani i wsp., 2018).

Markerem biologicznym biogenezy mitochondriów i istotnym regulatorem ich zdolności oksydacyjnej jest koaktywator receptora  $\gamma$  aktywowanego przez proliferator peroksysomów  $1\alpha$  (PGC-1  $\alpha$ ). Pod wpływem fosforylacji PGC-1  $\alpha$ , 5' kinaza białkowa aktywowana monofosforanem adenozy (AMPK) powoduje jego aktywację, w następstwie, czego prowadzi do koaktywacji jądrowego czynnika oddechowego 1 i 2 NRF1/NRF2, receptora estrogenowego i receptora aktywowanego przez proliferator peroksysomów  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) (Halling i Pilegaard, 2020). Aktywacja wyżej wymienionych białek, powoduje ekspresję genów mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A, transkrypcji i translacji mDNA. Następnym etapem jest promowanie ekspresji genów kompleksów mitochondrialnych za pośrednictwem szlaku PGC-1 $\alpha$ -NRF-1/2, czego rezultatem jest aktywacja fosforylacji oksydacyjnej (Taherzadeh-Fard i wsp., 2011). Wykazano, że wyciszenie PGC-1 $\alpha$  powoduje istotny spadek mitochondriów dendrytycznych oraz zmniejszenie liczby kolców dendrytycznych i synaps w hipokampie (Cheng i wsp., 2012). Co więcej w neuronach embrionalnych, jak również w wykształconym mózgu, PGC-1 $\alpha$  odgrywa kluczową funkcję w tworzeniu, a także w utrzymaniu synaps (Spillane i wsp., 2013).

Mitochondria są niezbędne dla życia komórki, jej aktywności, adaptacji i tolerancji na czynniki środowiskowe. Mimo, iż masa ludzkiego mózgu stanowi około 2% masy ciała to szacuje się, że jest on organem odpowiadającym za 20% całkowitego wydatku energetycznego (Clark i Sokoloff, 1999). 70-80% zużywanej energii jest wykorzystywana przez neurony, natomiast pozostała część przez komórki glejowe (astrocyty, oligodendrocyty i mikroglej) (Camandola i Mattson, 2017; Hyder i wsp., 2013). Adenozyno trójfosforan (ATP), wytwarzany przez mitochondria jest niezbędny do dostarczenia energii i ostatecznie prawidłowego funkcjonowania, wzrostu i regeneracji neuronów. Jako najbardziej energochłonne komórki organizmu, neurony są niezwykle

wrażliwe na defekty bioenergetyczne (Cheng i wsp., 2022), które istotnie przyczyniają się do pogorszenia funkcji poznawczych (Yin i wsp., 2016).

### 3.7.1. Metabolizm i bioenergetyka neuronów

Jako półautonomiczne organelle, mitochondria są bardzo wydajne pod względem zdolności wykorzystywania tlenu, glukozy i pirogronianiu, do generowania energii komórkowej w postaci ATP. Procesy bioenergetyczne neuronów opierają się wyłącznie na metabolizmie tlenowym, a ich głównym substratem energetycznym jest glukoza. W mózgu jest ona prawie całkowicie utleniana do dwutlenku węgla i wody poprzez drogę glikolizy i cykl kwasów trikarboksylowych (cykl kwasu cytrynowego, cykl Krebsa; CKT). W efekcie wymienionych procesów z jednej cząsteczki glukozy może powstać od 32 do 38 cząsteczek ATP (Allaman i Magistretti, 2013) (Rycina 4.).

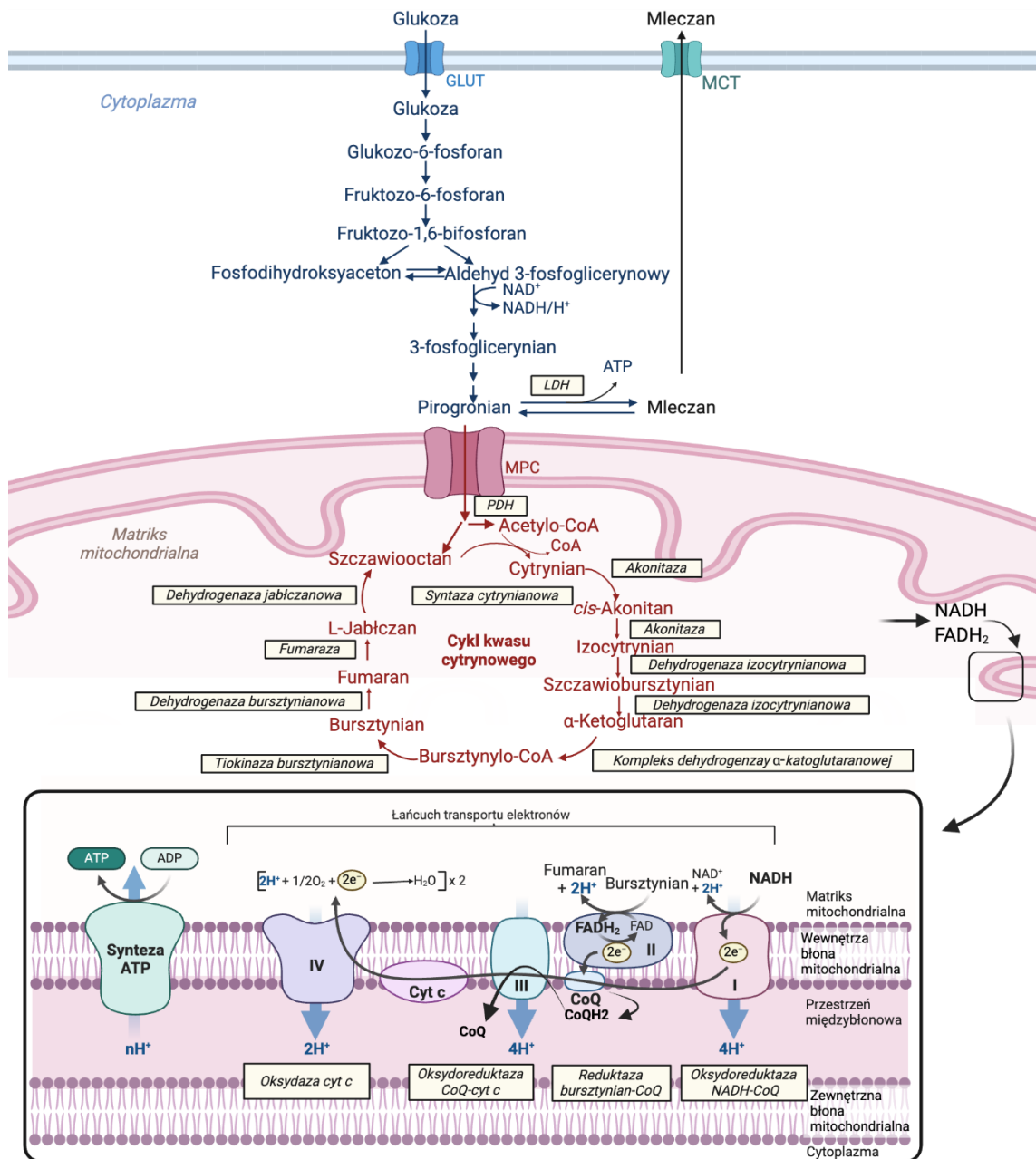
Specyficzne rozmieszczenie białka transportującego mleczan (MCT) oraz właściwości metabolicznych astrocytów i neuronów stworzyły podstawy do sformułowania hipotezy, iż mleczan może być transportowany między tymi komórkami celem wsparcia metabolizmu neuronalnego (Pellerin i wsp., 1998). Jednakże wyraźne dowody na rolę mleczanu w procesach metabolicznych *in vivo* pojawiły się dopiero na przełomie XX i XXI wieku (Bouzier i wsp., 2000; Wyss i wsp., 2011). Badania *in vitro* wykazują, że preferowanym substratem energetycznym neuronów jest mleczan, przy równoczesnym dostarczaniu z glukozą (Itoh i wsp., 2003). Pirogronian może zostać przekształcony do mleczanu poprzez dehydrogenazę mleczanową (LDH) lub zostać pobrany przez komórkę i włączony do dalszych procesów metabolicznych.

Pirogronian pod wpływem dehydrogenazy pirogronianowej zostaje przekształcony do acetylo-koenzymu A (CoA) i jest włączony do CKT (Rigoulet i wsp., 2020). Cytosolowy szlak glikolityczny, mitochondrialny CKT oraz fosforylacja oksydacyjna stanowią trzy główne komponenty energetycznego metabolizmu komórkowego. Jednakże większość ATP zużywanego przez neurony powstaje dzięki dwóm ostatnim procesom metabolicznym zachodzącym w mitochondriach.

Pierwszym reakcją mitochondrialnego metabolizmu energetycznego jest przeniesienie grupy acetylowej CoA do szczawiooctanu, katalizowane przez syntazę cytrynianową (CS), tworząc cytrynian. CS jest kluczowym enzymem w regulacji produkcji energii poprzez metabolizm mitochondrialny, jak również enzym ten istotnie

ogranicza szybkość zachodzących reakcji w CKT. Aktywność CS w przekształcaniu acetylo-CoA i szczawiooctanu do cytrynianu jest stosowana, jako biomarker zawartości i funkcji mitochondriów (Jacobs i wsp., 2013; Larsen i wsp., 2012). Następnie, w wyniku szeregu reakcji enzymatycznych cytrynian zostaje przekształcony do szczawiooctanu (Rodwell i wsp., 2018) (Rycina 4.).

Istotnymi produktami syntetyzowanymi na drodze CKT są NADH i FADH<sub>2</sub> (Rycina 4.). Koenzymy te mogą dostarczać elektrony do odpowiednich kompleksów łańcucha transportu elektronów. Mitochondrialny łańcuch oddechowy składa się z czterech kompleksów białkowych osadzonych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, których zadaniem jest utlenianie NADH i FADH<sub>2</sub>. Funkcją kompleksu I (oksydoreduktaza NADH – CoQ) i II (reduktaza bursztynian – CoQ) jest dostarczenie elektronów do ubichinonu. Następnie CoQ przekazuje elektrony do kompleksu III (oksydoreduktaza CoQ – cytochrom c (cyt c), który przekazuje je do cytochromu c. Kolejnym etapem jest przeniesienie elektronów przez zredukowany cytochrom c do kompleksu IV (oksydaza cyt c; COX), który ostatecznie przekazuje elektrony do tlenu cząsteczkowego (Rycina 4.) (Sousa i wsp., 2018). Ostatnim etapem fosforylacji oksydacyjnej, jest kompleks V (syntaza ATP), który syntetyzuje adenozyndifosforan (ADP) do ATP, wykorzystując energię dostarczoną z elektrochemicznego gradientu protonów (Rodwell i wsp., 2018) (Rycina 4.).



Rycina 4. Komórkowy metabolizm energetyczny. **Skróty:** GLUT, transporter glukozy; MCT, białko transportujące mleczan; NAD<sup>+</sup>, forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; NADH, dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy; MPC, białko transportowe translokazy pirogronianowej; PDH, kompleks dehydrogenazy pirogronianowej; CoA, acetylo-koenzym A; FADH<sub>2</sub>, dinukleotyd flawinoadeninowy; Cyt c, cytochrom c; LDH, kompleks dehydrogenazy mleczanowej. Rycina Biorender.com [przekształcona] na podstawie Rigoulet i wsp., 2020 oraz Zheng i wsp., 2016.

W zależności od czasu trwania oraz stężenia GK mogą wywierać odmienne działanie w neuronach. Fizjologiczne poziomy GK mają wpływ neuroprotekcynyjny poprzez

regulację funkcji mitochondriów. Powodują zwiększoną produkcję energii w efekcie zwiększonego zatrzymywania jonów wapnia i wzrostu potencjału błonowego w mitochondriach (Choi i Han, 2021). Natomiast postuluje się, że wysokie poziomy GK powodują uszkodzenia mitochondriów i śmierć komórki neuronalnej (Xu i wsp., 2019).

Stwierdza się, że niedobory metabolizmu mitochondrialnego, które mogą być obserwowane podczas wysokiego poziomu GK, mogą przyczyniać się do rozwoju hipometabolizmu i stresu oksydacyjnego. Wszelkie zmiany w metabolizmie glukozy sprzyjają deficytom metabolicznym w neuronach. Takie odchylenia w metabolizmie mogą wpływać na nieprawidłowe funkcjonowanie neuronów, ze względu na wysokie zapotrzebowanie energetyczne mózgu (Harris i wsp., 2012).

Naukowcy sugerują, że krótkotrwałe leczenie DEXA, w sposób zależny od błonowego GR, powoduje obniżenie aktywności I i II kompleksu mitochondrialnego łańcucha oddechowego i zwiększenie aktywności kompleksu III. Natomiast przewlekłe stosowanie DEXA związane z błonową i cytozolową aktywnością GR, powoduje dodatkowo wzrost aktywności IV kompleksu łańcucha oddechowego i jednocześnie spadek wydajności fosforylacji oksydacyjnej (Desquirit i wsp., 2008).

### **3.7.2. Reaktywne formy tlenu i stres oksydacyjny**

Reaktywne formy tlenu (RFT; ang. reactive oxygen species – ROS) określane są jako pochodne cząsteczki tlenu o wysokiej reaktywności. Mogą występować w formie rodników posiadających jeden lub więcej, niesparowanych elektronów na orbicie zewnętrznej, anionów lub cząsteczek zamkniętopowłokowych. Do RFT należą m.in.: rodnik hydroksylowy ( $\cdot\text{OH}$ ), rodnik nadadtlenkowy ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), tlen singletowy ( $^1\text{O}_2$ ) oraz nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Do głównych endogennych źródeł powstawania RFT między innymi należą: mitochondrialny łańcuch transportu elektronów, oksydazy NADPH/NADH (NOX) i oksydaza ksantynowa (XO) (Kaczor i wsp., 2017) natomiast pozostałe źródła obejmują, siateczkę śródplazmatyczną, peroksydazy (laktoperoksydazę, mieloperoksydazę i peroksydazę eozynofilową) i cyklooksygenazy (de Almeida i wsp., 2022).

RFT w procesach fizjologicznych odgrywają istotną rolę w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej pośrednicząc w proliferacji, różnicowaniu, procesach prozapalnych i apoptozie (Sies i wsp., 2022). Wysoki poziom RFT utrzymuje się

w strukturach neurogennych mózgowia (hipokampie i opuszce węchowej), mogą więc one pełnić istotną funkcję w neurogenezie zarówno centralnego, jak i obwodowego układu nerwowego (Dickinson i wsp., 2011; Stemple i Anderson, 1992). Neurony wywodzące się z korowych komórek progenitorowych, aktywnie syntetyzują RFT jednocześnie wpływając na ich morfologię oraz determinując czas neurogenezy (Forsberg i wsp., 2013; Tsatmali i wsp., 2006). Ponadto RFT wytwarzane przez NOX modulują dynamikę cytoszkieletu i przyczyniają się do wzrostu neuronalnych aksonów hipokampu (Wilson i wsp., 2015). Losy komórek są zasadniczo determinowane przez poziom RFT oraz czas ich ekspozycji (Schieber i Chandel, 2014). Zauważa się jednak, że umiarkowanie zwiększone poziomy RFT wpływają na kontrolę ogólnoustrojowych mechanizmów adaptacyjnych, wspierających zdrowie organizmu. Proces ten określa się mianem mitohormezy lub hormezy mitochondrialnej (Ristow i Schmeisser, 2014).

RFT cechuje wysoka reaktywność, przez co mają one zdolność do interakcji z różnymi makromolekułami. W wysokich stężeniach powodują peroksydację lipidów, uszkodzenia białek i kwasów nukleinowych, co w konsekwencji może prowadzić do śmierci komórki (Juan i wsp., 2021). Do najczęściej oznaczanych markerów stresu oksydacyjnego należą produkty peroksydacji lipidów. Do markerów wolnorodnikowych uszkodzeń lipidów zalicza się dialdehyd malonowy (MDA) i izoprostany, ale również 4-hydroksynonenal (4-HNE). Rodnik hydroksylowy, najbardziej reaktywny, silnie reaguje z większością cząsteczek organicznych powodując uszkodzenia lipidów, białek i kwasów nukleinowych. Proces peroksydacji lipidów zasadniczo przebiega w trzech etapach: inicjacji, propagacji i terminacji. W wyniku wolnorodnikowego utlenienia lipidów – szczególnie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) dochodzi do powstania między innymi rodnika lipidowego. Końcowymi produktami procesu peroksydacji lipidów są wodorotlenki lipidów, które wchodząc w kolejne reakcje powodują powstawanie aldehydów takich jak MDA, 4-HNE, czy 8-izoprostany a wzrost ich stężenia świadczy o wolnorodnikowym uszkodzeniu lipidów (Ito i wsp., 2019). Atak RFT prowadzi również do uszkodzeń białek, kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) i rybonukleinowego (RNA). Do powszechnie stosowanych markerów wolnorodnikowego uszkodzenia białek między innymi należą: wzrost zawartości grup karbonylowych, spadek poziomu grup sulfhydrylowych (-SH), wzrost stężenia 3-nitrotyrozyny, czy sulfotlenku metioniny (Kehm i wsp., 2021). Natomiast markerami uszkodzeń kwasu DNA jest między innymi wzrost stężenia

8-hydroksy-2-deoksyguanozyna, 8-okso-7,8-dihydro-2-deoksyguanozynai 8-okso-7,8 dihydroguanozyna (Guo i wsp., 2017). W przypadku RNA, uszkodzenia spowodowane RFT są oznaczane poprzez wzrost stężenia 8-oksoguanozyna, 8-hydroksyadenina i 5-hydroksycytozyna (Kong i wsp., 2008).

Zaburzenie równowagi pomiędzy produkcją RFT a zdolnością do ich usuwania lub naprawą uszkodzeń nimi spowodowanych określane jest mianem stresu oksydacyjnego (Flohé, 2020). Sprzyja on procesowi starzenia (Krisko i Radman, 2019) i rozwojowi wielu chorób (Bashan i wsp., 2009; Li i wsp., 2013). Liczne zaburzenia kliniczne powiązane z RFT .in.. choroby psychiczne (depresja, schizofrenia) czy choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona, stwardnienie zanikowe boczne, stwardnienie rozsiane) (Singh i wsp., 2019). Ponadto nadprodukcja RFT może sprzyjać rozwojowi nowotworów między innymi płuc, jelita grubego i prostaty (Azad i wsp., 2008; Lim i wsp., 2005; Zeng i wsp., 2021).

Tkanka nerwowa, bogata w substraty ulegające utlenieniu, podatna jest na uszkodzenia wolnorodnikowe. Wynika to z wysokiego zapotrzebowania tkanki na tlen, relatywnie wysokiej zasobności katalitycznych metali przejściowych (miedzi – Cu oraz jonu żelazawego –  $Fe^{2+}$ ) i stosunkowo niskiej ilości enzymów przeciwutleniających (Halliwell, 1992; Halliwell, 1999). Utrzymanie niskiego poziomu RFT umożliwia utrzymanie komórek we względnej homeostazie (Valko i wsp., 2007). Równowaga ta wynika z aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich jak cytoplazmatycznej i mitochondrialnej dysmutazy nadadtlenkowej, peroksydazy glutationowej (GPx), reduktazy glutationowej (GR), czy katalazy. Ponadto druga linia obrony określana jako antyoksydanty (askorbinian, witamina E, karotenoidy, polifenole, glutationu (GSH) i wiele innych) wspomaga utrzymanie RFT na odpowiednim poziomie (Bouayed i Bohn, 2010).

Na poziomie mikrocząsteczkowym, jednym z kluczowych przeciwutleniaczy jest GSH – endogeny tripeptyd złożony z aminokwasów: kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly). Bierze on udział w wielu funkcjach komórkowych, w tym odpowiedzi antyoksydacyjnej, regulacji redoks, detoksykacji ksenobiotyków, metabolizmie żelaza, przekazywaniu sygnału i ekspresji genów (Forman i wsp., 2009). Związek ten występuje w cytoplazmie, mitochondriach oraz jądrze komórkowym. Pełni funkcję kofaktora enzymów antyoksydacyjnych, takich jak transferaza glutationowa,

GPx i reduktaza glutationowa. Ponadto, stanowi on zasobnik niebiałkowych grup -SH w komórkach, które odgrywają istotną rolę w utrzymaniu homeostazy stanu redoks. Ponadto grupy -SH oddziałują z grupami -SH białek, co prowadzi do ich stabilizacji oraz utrzymania prawidłowej struktury. Niektóre badania sugerują, że stres oksydacyjny leży u podstaw uszkodzeń strukturalnych hipokampu w rozwijającym się organizmie (Abbah i wsp., 2022). Jednym z mechanizmów wynikających z działania GK, jest rozregulowanie aktywności mitochondriów i wynikająca z niego komórkowa akumulacja RTF. Wykazano, że zwiększony poziom GK jest związany ze stresem oksydacyjnym, a w konsekwencji rozwojem zaburzeń psychicznych i neurodegeneracyjnych (Bhatt i wsp., 2020; Karnia i wsp., 2018).

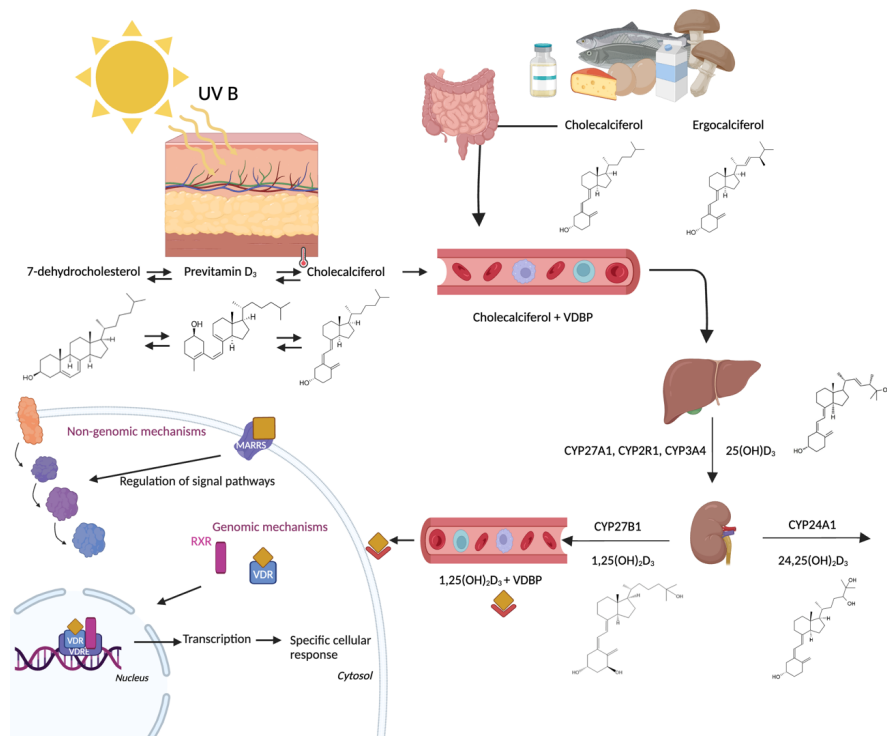
### **3.8. Witamina D**

Witamina D występuje w dwóch postaciach: cholekalcyferolu ( $D_3$ ) – wytwarzanego przez zwierzęta i ergokalcyferolu ( $D_2$ ) – wytwarzanego przez rośliny i grzyby. Formy te różnią się strukturalnie łańcuchem bocznym, jednak nie różnią się w aktywności biologicznej. Witamina  $D_3$  jest wytwarzana pod wpływem ekspozycji skóry na promieniowanie UV B (290-315nm). Proces ten rozpoczyna się w keratynocytach naskórka, gdzie 7-dehydrocholesterol podlega fotoizomeryzacji tworząc tym samym pre-witaminę D – cholekalcyferol (Płomiński i wsp., 2022).

Cholekalcyferol łącząc się z białkiem wiążącym witaminę D (VDBP) jest transportowany wraz z krwią do wątroby. Pod wpływem CYP27A1, CYP2R1 i CYP3A4 ulega tam hydroksylacji przy węglu C-25 do formy nieaktywnej biologicznie - kalcyfediolu ( $25(OH)D_3$ ). Następnie, pod wpływem hydroksylazy CYP27B1,  $25(OH)D_3$  jest hydroksylowana w pozycji C-1 do aktywnej formy – kalcytriolu ( $1,25(OH)_2D_3$ ) (Rycina 5.). Proces ten zachodzi głównie w nerkach, ale również innych tkankach, takich jak kości, jelita, przytarczyce, serce, skóra i mózg (Bikle, 2000; Eyles i wsp., 2005). Aktywacja CYP27B1 niezbędnego do syntezy  $1,25(OH)_2D_3$ , jest regulowana przez parathormon (PTH) w odpowiedzi na niskie stężenia wapnia lub fosforu we krwi (Wacker i Holick, 2013). Za katabolizm witaminy D odpowiedzialny jest CYP24A1 powodujący hydroksylację C-24 i przekształcenie do nieaktywnej formy  $24,25(OH)_2D_3$  (Bikle, 2000). W mechanizmach komórkowych, zarówno genomowych jak i niegenomowych,  $1,25(OH)_2D_3$  bierze udział wiążąc się z receptorem witaminy D (VDR) (Rycina 5.). Receptor ten należy do nadrodziny receptorów jądrowych i jest zależnym od liganda



regulatorem transkrypcji (Cui i wsp., 2017). Receptor witaminy D (VDR) ulega ekspresji w wielu tkankach organizmu w tym: jelitach, kościach, nerkach, mięśniach szkieletowych, skórze, ale również komórkach nerwowych i glejowych (Gáll i Székely, 2021).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  przenika przez barierę krew-mózg i wiąże się w strukturach mózgowia (m.in. kora mózgowa, ciało migdałowate, prążkowie, hipokamp) z VDR. Kompleks VDR:ligand może dotrzeć do jądra komórkowego tworząc heterodimer z receptorem retinoidu X (RXR) modulując mechanizmy komórkowe na poziomie genomu (Seuter i wsp., 2016) wiążąc się z elementami odpowiedzi witaminy D (VDRE). W hipokampie, VDR obecny jest w warstwach piramidalnych i ziarnistych, komórkach glejowych oraz w podpolach CA1-3, ale również w zakręcie zębatym (Eyles i wsp., 2005; Lee i wsp., 2020; Liu i wsp., 2021; Prüfer i wsp., 1999), gdzie może podlegać wpływowi wielu czynników.



Rycina 5. Opis metabolizmu witaminy D oraz wewnątrzkomórkowy wpływ jej działania.

**Skróty:** VDRB, białko wiążące witaminę D; VDR, receptor witaminy D; VDRE, element odpowiedzi witaminy D; RXR, receptor retinoidu X; MARRS, białko wiążące steroidy o szybkiej odpowiedzi związanej z błoną. Opracowanie własne na podstawie Botelho i wsp., 2020 oraz Dominguez i wsp., 2021.

Do czynników modulujących ekspresję VDR zalicza się między innymi hormony peptydowe, steroidowe, czynniki wzrostu oraz czynniki zapalne (Kongsbak i wsp., 2013). Witamina D bierze udział również w mechanizmach niegenomowych poprzez wiązanie z białkiem wiążącym steroidy o szybkiej odpowiedzi związanej z błoną (MARRS) obecnym w błonie komórkowej oraz obszarze około jądrowym.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wpływa wówczas na otwarcie kanałów wapniowych, szlaki sygnałowe aktywowane przez wapń. Zauważono również zależność z aktywacją niektórych kinaz m.in. z PI3K, p38MAPK, kinazą białkową C (PKC) (Hii i Ferrante, 2016). Natomiast niegenomowy wpływ witaminy D w mózgu prawdopodobnie przejawia się w procesach wewnątrzkomórkowych, ale również synaptycznych. Ponadto wpływa na pobudzenie neuroprzekaźników receptora N-metylo-D-asparaginianowego (NMDA) i kainianowego (Bhattarai i wsp., 2017).

Istnieje wiele czynników, które mogą prowadzić do deficytu  $25(\text{OH})\text{D}_3$  we krwi. Zalicza się do nich między innymi: czas ekspozycji na słońce, zamieszkiwaną szerokość geograficzną, wiek, płeć, masę ciała, pigmentację skóry, nawyki żywieniowe i styl życia (Holick, 2017; Płudowski i wsp., 2023). W badaniach przeprowadzonych przez Płudowskiego i wsp. na 5775 ochotnikach wynika, że 85% polskiego społeczeństwa ma poważne lub umiarkowane niedobory witaminy D (Płudowski i wsp., 2016; Płudowski, 2023b). Inne doniesienia wskazują, że około 40% mieszkańców Europy ma niedobory witaminy D, z czego 13% populacji niedobory znaczne (Cashman i wsp., 2016). Jako ciężki niedobór witaminy D definiuje się poziom  $25(\text{OH})\text{D}_3$  poniżej 10 ng/ml surowicy krwi, natomiast niedobór określany jest między 10-20 ng/ml. Poziom niewystarczający to stężenie 20-30 ng/ml, a za optimum uznaje się poziom między 30-50 ng/ml. Toksyczność witaminy D występuje powyżej 100 ng/ml  $25(\text{OH})\text{D}_3$  (Rusińska i wsp., 2018) (Tabela 2.). Uważa się, że toksyczność witaminy D związana jest jedynie z podażą doustną suplementów w wysokich dawkach lub stanami chorobowymi m.in. sarkoidozą (Tebben i wsp., 2016). Natomiast nadmierna ekspozycja słoneczna nie powoduje toksyczności witaminy D, ze względu na protekcyjne procesy regulacyjne. Charakterystycznymi objawami hiperwitaminozy D są hiperkalcemia oraz hiperkalciuria, nudności, wymioty, ból brzuch, zapalenie trzustki, kamica nerkowa. Ponadto mogą wystąpić również: zwapnienie tkanek miękkich, aorty, arytmia serca czy miażdżyca (Fraser, 2021). Co więcej nieprawidłowo zwiększone stężenie witaminy D w organizmie związane jest z wystąpieniem objawów neurologicznych, takich jak apatia, dezorientacja,

drażliwość, pobudzenie, otępienie czy nawet śpiączka (Asif i Farooq, 2023). Niedawne badania wykazały, że 4 dniowa suplementacja witaminy D o dawce 25 000IU/ kg spowodowała obniżenie aktywności fal mózgowych u szczurów (Lima i wsp., 2022).

*Tabela 2. Progi diagnostyczne witaminy D oraz rekomendacje suplementacji witaminy D<sub>3</sub> w Polsce od 2018 roku (Płudowski i wsp., 2023).*

| <b>Progi diagnostyczne określające poziom witaminy D na podstawie stężenia 25(OH)D w surowicy (ng / ml) – 1ng/ ml = 2,5 nmol/ l</b> |                                  |   |                                  |
|---|----------------------------------|---|----------------------------------|
| <b>Toksyczny</b>  |                                  | >100  |                                  |
| <b>Optymalny</b>  |                                  | 30-50   |                                  |
| <b>Suboptymalny</b>   |                                  | 20-30   |                                  |
| <b>Niedobór</b>   |                                  | 10-20   |                                  |
| <b>Ciężki niedobór</b>  |                                  | <10   |                                  |
| <b>Zalecane dawki dobowej suplementacji</b>   |                                  | <b>Zalecane dawki dobowej suplementacji w przypadku leczenia niedoborów</b> |                                  |
| <b>Wiek</b>   | <b>Suplementacja (IU/ dzień)</b> | <b>Wiek</b>   | <b>Suplementacja (IU/ dzień)</b> |
| <b>0-6 miesięcy</b>   | 400                              | <b>0-12 miesięcy</b>  | 2000                             |
| <b>6-12 miesięcy</b>  | 400-600                          | <b>2-10 lat</b>   | 3000-6000                        |
| <b>2-10 lat</b>   | 600-1000                         | <b>11-18 lat</b>  | 6000                             |
| <b>11-18 lat</b>  | 800-2000                         | <b>&gt;18 lat</b>   | 6000                             |
| <b>&gt;18 lat</b>   | 800-2000                         |   |                                  |
| <b>&gt;75 lat</b>   | 2000-4000                        |   |                                  |
| <b>Ciąża i laktacja</b>   | 2000                             |   |                                  |

Działanie witaminy D nie ogranicza się jedynie do regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej, lecz wykazuje plejotropową aktywność (Płudowski i wsp., 2019). Ciężkie niedobory witaminy D skorelowane są z rozwojem wielu jednostek chorobowych: łuszczyca, cukrzyca typu 1 i 2, stwardnienia rozsianego, reumatoidalnego zapalenia stawów, gruźlica, infekcji układu oddechowego i COVID-19. Wydaje się

również, że mogą mieć związek z neuropsychiatrycznymi zaburzeniami takimi jak: schizofrenia, depresja, jak również chorobami neurodegeneracyjnymi takimi jak choroba Alzheimera czy Parkinsona (Charoenngam i Holick, 2020). Lasoń i współautorzy sugerują, że stosowanie witaminy D<sub>3</sub> oraz stymulacja VDR mogą potencjalnie przyczynić się do neuroprotekcji w chorobach otępiennych i neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona (Lasoń i wsp., 2023). Coraz więcej badań eksperymentalnych sugeruje również kluczową rolę witaminy D w rozwoju mózgu. Uważa się, że może ona mieć wpływ na modulowanie długości aksonów, syntezę neuroprzekazników i neurotrofin oraz w efekcie wpływać na funkcjonowanie mózgu (Eyles, 2021). Niedawno przedstawiono wyniki badań związanych z mechanizmami epigenetycznymi regulacji genów w rozwijającym się mózgu, w których niedobory witaminy D zwiększają ryzyko stanu przedrzucawkowego oraz rozwoju schizofrenii u potomstwa (Ali i wsp., 2019; Aparecida Nedel Pertile i wsp., 2022).

W ostatnich latach intensywnie badany jest temat witaminy D jako jednego z głównych neurosteroidów biorących udział w neurogenezie i neuroplastyczności w dorosłym mózgu. Wyniki badań wykazują, że suplementacja kalcytrionem ma wpływ na wzrost poziomu BDNF w hipokampie szczurów i łagodzi zaburzenia poznawcze (Abdollahzadeh i wsp., 2022). W innych badaniach wykazano, że suplementacja witaminy D<sub>3</sub> łagodzi deficyty pamięci wywołane wiekiem i powoduje wzrost ekspresji czynnika wzrostu nerwów (NGF) i BDNF w hipokampie (Bayat i wsp., 2021). Wydaje się, że witamina D jest ważnym elementem w procesach ontogenezy mózgu, poprzez regulację czynników neurotroficznych. Tym bardziej uważam za istotne określenie wpływu suplementacji witaminą D<sub>3</sub> podczas przewlekłego leczenia DEXA i przewlekłego narażenia na zimno na neurogenezę, mitochondrialny metabolizm energetyczny oraz poziom białek zaangażowanych w aktywność szlaku sygnalizacyjnego Akt za pośrednictwem BDNF w szczurzym hipokampie.

## 4. Cel badań

Celem badań była:

- Ocena wpływu suplementacji witaminą D<sub>3</sub> na zawartość receptorów glikokortykoidowych, mineralokortykoidowych i receptora witaminy D w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.
- Określenie wpływu suplementacji witaminą D<sub>3</sub> na zawartość białek biorących udział w sygnalizacji komórkowej i markerów stresu oksydacyjnego w hipokampie szczurów w trakcie długotrwałego działania glikokortykosteroidów.
- Ocena wpływu suplementacji witaminą D<sub>3</sub> na aktywność i zawartość wybranych białek mitochondrialnego metabolizmu energetycznego w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

## 5. Hipotezy

- Suplementacja witaminą D<sub>3</sub> spowoduje zmiany na poziomie receptorów glikokortykoidowych, mineralokortykoidowych i receptora witaminy D w szczurzym hipokampie w trakcie długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.
- Suplementacja witaminą D<sub>3</sub> spowoduje wzrost poziomu białek o charakterze neuroprotekcijnym i obniży poziom markerów stresu oksydacyjnego w hipokampie szczurów podczas długotrwałego działania glikokortykosteroidów.
- Suplementacja witaminą D<sub>3</sub> wpłynie ochronnie na aktywność i zawartość wybranych białek mitochondrialnego metabolizmu energetycznego w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

## 6. Publikacje naukowe

### 6.1. Artykuł 1

The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy

Mateusz Jakub Karnia, **Daria Korewo**, Dorota Myślińska,  
Ziemowit Maciej Ciepielewski, Monika Puchalska, Klaudia Konieczna-Wolska,  
Konrad Kowalski, Jan Jacek Kaczor

NUTRIENTS

2021, VOL.13, NO. 13(3):936

<https://doi.org/10.3390/nu13030936>

W tej pracy cytowany jako (Karnia i wsp., 2021)

## Omówienie I artykułu

W pracy zatytułowanej „**The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoids-dependent Skeletal Muscle Atrophy**” (podrozdział 7.1.) głównym celem była ocena zdolności witaminy D w hamowaniu atrofii mięśniowej szczurów wywołanej długotrwałą ekspozycją na działanie glikokortykosteroidów (GK). Badania zostały przeprowadzone w dwóch modelach: przewlekłego podawania syntetycznych GK w formie iniekcji dootrzewnowej – deksametazonu (DEXA) oraz aktywowanie osi podwzgórze – przysadka – nadnercza (PPN) poprzez systematyczne zanurzenie zwierząt w zimnej wodzie. Wykazaliśmy, że podawanie DEXA powoduje obniżenie poziomu 25-hydroksy witaminy D w osoczu szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast suplementacja witaminy D<sub>3</sub> powoduje wzrost stężenia 25(OH)D<sub>3</sub> i jej metabolitów we krwi. Ma to swoje przełożenie na wyniki masy ciała a także mas mięśni i wybranych narządów wewnętrznych. Zgodnie z naszymi założeniami, w grupie traktowanej DEXA zaobserwowaliśmy znaczące obniżenie masy ciała oraz mięśnia płaszczkowatego (*soleus*; SOL) i prostownika palców długich (*extensor digitorum longus*; EDL), napinacza. Ponadto wykazaliśmy, że stosowanie DEXA może powodować istotny spadek masy narządów układu immunologicznego: grasicę i śledzionę. Niemniej jednak, udowodniono ochronny, antyatroficzny wpływ witaminy D na szkodliwe działanie DEXA w obrębie mięśnia czerwonego, SOL, jak również częściowo protekcyjny wpływ na masę grasicy. Wyniki uzyskane w drugim modelu badań, zgodnie z naszymi założeniami, potwierdziły, że długotrwałe, systematyczne zanurzanie zwierząt w zimnej wodzie spowoduje znaczący wzrost kortykosteronu (KORT) w osoczu w stosunku do grupy zanurzanej w ciepłej wodzie (pozorny stresor). Uzyskane wyniki są sprzeczne z naszymi założeniami, gdyż w modelu tym nie obserwowaliśmy istotnych zmian masy ciała i mas mięśni. Takie rezultaty mogą być efektem specyfiki wybranego stresora, gdzie prawdopodobnie pod wpływem zimna dochodzi do nasilenia lipogenezy i/lub syntezy białek mięśniowych w wyniku termogenezy drzeniowej. Jednakże spostrzegliśmy znaczące obniżenie masy grasicy w grupie placebo w porównaniu z grupą pozornego wystawienia na stresor. Wydaje się, że uzyskane, w ramach eksperymentu, wyniki wykazują dwukierunkowe działanie GK, natomiast suplementacja witaminy D<sub>3</sub> może tylko częściowo ochronić przed ich negatywnymi skutkami.



### **6.1.1. Oświadczenia współautorów**

Gdańsk, 14.05.2024

Mateusz Jakub Karnia  
*imię i nazwisko współautora*

W trakcie publikacji artykułu:

Katedra Fizjologii i Biochemii, Gdańska Akademia Wychowania Fizycznego i Sportu,  
Kazimierza Górskiego 1, 80-336 Gdańsk, Polska

Obecnie:

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,  
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

### Oświadczenie współautora

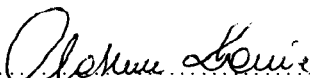
W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych Pani Darii Korewo-Labelle oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

„Karnia, M.J.; Korewo, D.; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* 2021, 13, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936>” wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. Wpływ suplementacji witaminą D3 na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie powyższego artykułu polegał na:

-przygotowaniu projektu, przeprowadzeniu badań, analizie statystycznej, interpretacji wyników, przygotowaniu publikacji i korektach manuskryptu, opracowaniu piśmiennictwa i pozyskaniu funduszy.

Gdańsk 14.05.2024

..........  
*podpis współautora*

Daria Korewo-Labelle

Gdańsk, 14.05.2024 r.

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka,  
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,  
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

### Oświadczenie kandydata

W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych oświadczam, że jestem wiodącym współautorem publikacji:

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

1. Karnia, M.J.; **Korewo, D.**; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* 2021, *13*, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936>

W wyżej wymienionym artykule mój udział prac obejmował:

- pozyskanie materiału do badań
- prace laboratoryjne

Gdańsk, 15.05.2024r.....

.....Daria Korewo-Labelle

Gdańsk, 14.05.2024

Dorota Myślińska  
*imię i nazwisko współautora*

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, Wita  
Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

### Oświadczenie współautora

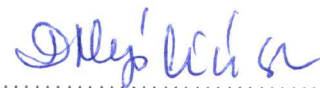
W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych Pani Darii Korewo-Labelle oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

„Karnia, M.J.; Korewo, D.; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* 2021, *13*, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936>” wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. Wpływ suplementacji witaminą D3 na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie powyższego artykułu polegał na:

-przeprowadzeniu badań

Gdańsk 14.05.2024



.....  
*podpis współautora*

Gdańsk, 14.05.2024

Ziemowit Maciej Ciepielewski  
*imię i nazwisko współautora*

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, Wita  
Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

### Oświadczenie współautora

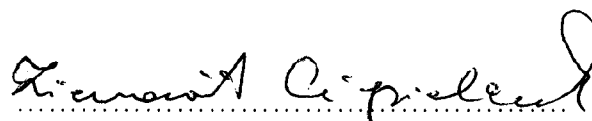
W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych Pani Darii Korewo-Labelle oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

„Karnia, M.J.; Korewo, D.; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* 2021, 13, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936>” wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. Wpływ suplementacji witaminą D3 na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie powyższego artykułu polegał na:

-przeprowadzeniu badań laboratoryjnych

Gdańsk .....15.05.24

  
.....  
*podpis współautora*

Warszawa, 07.06.2024

Monika Puchalska

*imię i nazwisko współautora*

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka,  
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,  
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

### Oświadczenie współautora

W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych Pani Darii Korewo-Labelle oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

„Karnia, M.J.; Korewo, D.; Myślińska, D.; Ciepiewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* 2021, 13, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936>” wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt.

Wpływ suplementacji witaminą D3 na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie powyższego artykułu polegał na:

-przeprowadzeniu badań laboratoryjnych

Warszawa

07/06/2024



*podpis współautora*

Gdańsk, 14.05.2024

Klaudia Konieczna-Wolska  
*imię i nazwisko współautora*

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka,  
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,  
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

### Oświadczenie współautora

W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych Pani Darii Korewo-Labelle oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

„Karnia, M.J.; Korewo, D.; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* 2021, *13*, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936>” wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. Wpływ suplementacji witaminą D3 na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów

Oświadczam, że mój wkład w powstanie powyższego artykułu polegał na:

-przeprowadzeniu badań laboratoryjnych

Gdańsk ..15.05.2024..

  
.....  
*podpis współautora*

Gdańsk, 14.05.2024

Konrad Kowalski  
*imię i nazwisko współautora*

Laboratorium Masdiag-Diagnostic Spektrometrii Mas, Stefana Żeromskiego 33, 01-882  
Warszawa, Polska

### Oświadczenie współautora

W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych Pani Darii Korewo-Labelle oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

„Karnia, M.J.; Korewo, D.; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* 2021, *13*, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936>” wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. Wpływ suplementacji witaminą D3 na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie powyższego artykułu polegał na:

-interpretacji wyników badań

Gdańsk .....

14.05.2024



.....  
*podpis współautora*



Gdańsk, 14.05.2024

Jan Jacek Kaczor

*imię i nazwisko współautora*

W trakcie publikacji artykułu:

Katedra Fizjologii i Biochemii, Gdańska Akademia Wychowania Fizycznego i Sportu,  
Kazimierza Górskiego 1, 80-336 Gdańsk, Polska

Obecnie:

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,  
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

### Oświadczenie współautora

W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych Pani Darii Korewo-Labelle oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

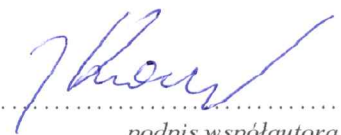
„Karnia, M.J.; Korewo, D.; Myślińska, D.; Ciepiewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* 2021, 13, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936>” wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. Wpływ suplementacji witaminą D3 na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie powyższego artykułu polegał na:

-przygotowaniu projektu badań, interpretacji wyników, przygotowaniu publikacji i korektach manuskryptu.

Gdańsk .....



15 V 2024

.....  


*podpis współautora*

## Article

# The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy

Mateusz Jakub Karnia <sup>1</sup>, Daria Korewo <sup>1</sup>, Dorota Myślińska <sup>2</sup>, Ziemowit Maciej Ciepielewski <sup>2</sup>, Monika Puchalska <sup>2</sup>, Klaudia Konieczna-Wolska <sup>2</sup>, Konrad Kowalski <sup>3</sup> and Jan Jacek Kaczor <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology and Biochemistry, Gdansk University of Physical Education and Sport, Kazimierza Górskiego 1, 80-336 Gdansk, Poland; mateusz.karnia@awf.gda.pl (M.J.K.); daria.korewo@awf.gda.pl (D.K.)

<sup>2</sup> Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Gdansk, Wita Stwosza 59, 80-308 Gdansk, Poland; dorota.myslinska@biol.ug.edu.pl (D.M.); ziemowit.ciepielewski@biol.ug.edu.pl (Z.M.C.); nika.puchalska@gmail.com (M.P.); kkonieczna7@gmail.com (K.K.-W.)

<sup>3</sup> Masdiag-Diagnostic Mass Spectrometry Laboratory, Stefana Żeromskiego 33, 01-882 Warsaw, Poland; konrad.kowalski@masdiag.pl

\* Correspondence: jan.kaczor@awf.gda.pl; Tel.: +48-58-554-72-55



**Citation:** Karnia, M.J.; Korewo, D.; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* **2021**, *13*, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936>

Academic Editors: Deborah Agostini and Sabrina Donati Zeppa

Received: 8 February 2021

Accepted: 11 March 2021

Published: 14 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** (1) The study aimed to investigate whether vitamin D<sub>3</sub> supplementation would positively affect rats with glucocorticoids-induced muscle atrophy as measured by skeletal muscle mass in two experimental conditions: chronic dexamethasone (DEX) administration and a model of the chronic stress response. (2) The study lasted 28 consecutive days and was performed on 45 male Wistar rats randomly divided into six groups. These included two groups treated by abdominal injection of DEX at a dose of 2 mg/kg/day supplemented with vegetable oil (DEX PL; *n* = 7) or with vitamin D<sub>3</sub> 600 IU/kg/day (DEX SUP; *n* = 8), respectively, and a control group treated with an abdominal injection of saline (CON; *n* = 6). In addition, there were two groups of rats chronically stressed by cold water immersion (1 hour/day in a glass box with 1-cm-deep ice/water mixture; temperature ~4 °C), which were supplemented with vegetable oil as a placebo (STR PL; *n* = 9) or vitamin D<sub>3</sub> at 600 IU/kg/day (STR SUP; *n* = 9). The last group was of sham-stressed rats (SHM; *n* = 6). Blood, soleus, extensor digitorum longus, gastrocnemius, tibialis anterior, and quadriceps femoris muscles were collected and weighed. The heart, liver, spleen, and thymus were removed and weighed immediately after sacrifice. The plasma corticosterone (CORT) and vitamin D<sub>3</sub> metabolites were measured. (3) We found elevated CORT levels in both cold water-immersed groups; however, they did not alter body and muscle weight. Body weight and muscle loss occurred in groups with exogenously administered DEX, with the exception of the soleus muscle in rats supplemented with vitamin D<sub>3</sub>. Decreased serum 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations in DEX-treated rats were observed, and the cold water immersion did not affect vitamin D<sub>3</sub> levels. (4) Our results indicate that DEX-induced muscle loss was abolished in rats supplemented with vitamin D<sub>3</sub>, especially in the soleus muscle.

**Keywords:** dexamethasone; chronic stress; corticosterone; cold water immersion; soleus

## 1. Introduction

Skeletal muscle accounts for approximately 40% of body mass and is a major target organ for glucocorticoids (GCs). Under stressful or pathophysiological conditions such as starvation, cancer, or coldness, circulating GC levels are greatly increased. Likewise, the long-term or high-dose administration of synthetic GCs such as dexamethasone (DEX) may lead to decreased protein synthesis and increase proteolysis to generate amino acids to serve as precursors for hepatic gluconeogenesis. In the skeletal muscles, this leads to many adverse effects, particularly skeletal muscle atrophy and muscle weakness [1].

Moreover, GC activity may differ depending on whether it is administered externally or is of internal origin in relation to the stress response [2]. As data show, administering

exogenous GCs like DEX to mimic a condition of physiological stress may not reflect a realistic condition to determine whether circulating GCs may attain the well-above peak levels observed during a stress response [3].

Vitamin D is considered to be a potent anti-catabolic compound [4,5]. Numerous studies suggest a positive role of vitamin D in sarcopenia prevention [6] or inhibition of muscle atrophy by suppression of forkhead box protein O1 (FOXO-1) transcriptional activity [7]. Some studies also imply that vitamin D has antioxidant potential both in the central nervous system [8] and skeletal muscles [9]. In work from our laboratory, we demonstrated that vitamin D deficiency induced protein peroxidation and atrophy in paraspinal muscle, and supplementation with vitamin D reversed those negative alterations [10,11]. On the other hand, the beneficial effect of vitamin D supplementation on skeletal muscle mass is questioned, and some research has indicated that vitamin D supplementation has little or no effect on muscle mass [12,13].

To our knowledge, there are no direct data on the effect of vitamin D<sub>3</sub> on GC-induced muscle atrophy; however, there is some research focused on GC-induced osteoporosis [14] and the influence of the vitamin D analogs in the context of GC-dependent myopathy [15,16]. The exact effect that GCs have on vitamin D<sub>3</sub> metabolism remains ambiguous. For instance, one study indicates that 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (calcitriol) stimulates (in human adipocytes) the expression of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD11B1) [17]. The same research shows that calcitriol may act through a rapid, non-genomic mechanism that also stimulates GC release in adipocytes by increasing Ca<sup>2+</sup> through 1,25-D<sub>3</sub>-membrane-associated rapid-response steroid binding (1,25-D<sub>3</sub>-MARRS) and, in consequence, increases the availability of GCs. Moreover, there is a report showing that calcitriol increases oxidative stress in cultured murine and human adipocytes [18]. Nevertheless, another study has shown a positive and highly selective type of activity of vitamin D, inducing oxidative stress only in malignant cells while sparing healthy cells [19].

In addition, serum vitamin D<sub>3</sub> deficiency attenuated the protein content of vitamin D receptor (VDR), with a simultaneous elevated level of peroxidation markers of lipids and proteins in multifidus muscle [11]. There is also evidence linking vitamin D<sub>3</sub> deficiency with GC administration. Data showed that patients who reported GC treatment were twice as likely to have vitamin D deficiency as compared to those without steroid use [20].

Furthermore, calcitriol is considered a true steroid hormone, and like GCs, it may exert several activities in many tissues and organs, demonstrating a synergistic effect in combined therapy [21]. An excellent example of this pharmacological approach is the use of calcitriol and DEX in patients with rheumatoid arthritis, where synovial fibroblast activation is abolished; this combination suppresses the expression of proinflammatory cytokines [22].

Vitamin D<sub>3</sub> has been reported to suppress FOXO-1 transcriptional activity [7], and deficiency of vitamin D<sub>3</sub> might induce skeletal muscle atrophy [10]. However, it is not clear whether vitamin D<sub>3</sub> could prevent GC-induced muscle loss *in vivo*. Thus, the current study aimed to explore whether vitamin D supplementation attenuated detrimental changes as measured by the body and skeletal muscle weight in chronic DEX-administered rats. We also suspected that cold water immersion as a model of the chronic stress response (CSR) would induce an exogenous GC surge and, in consequence, cause similar deleterious effects. Therefore, supplementation with vitamin D would reverse the adverse effect induced by elevated GCs in the CSR.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

The study was performed on 45 male Wistar rats (weighing approximately 300–400 g) obtained from the Medical University of Gdansk, Poland. For the whole experiment the animals were housed 3–4 per cage with food and water provided *ad libitum*, with a 12-h light/dark cycle and controlled environmental conditions: temperature 22 °C and

humidity 55%. Studies were conducted with the consent of the Local Bioethics Committee in Bydgoszcz, Poland (No. 12/2019), according to European guidelines.

## 2.2. Study Design

Two weeks before the experiment, animals were handled to acclimate and minimize stress. Next, rats were randomly divided into 6 groups. Two of these groups were treated with an abdominal injection of dexamethasone (Dexamethasone D4902, Sigma–Aldrich, MN, USA) at 2 mg/kg/day supplemented with vegetable oil (DEX PL;  $n = 7$ ), or vitamin D<sub>3</sub> (DEX SUP;  $n = 8$ ). The control group was treated using an abdominal injection of saline (CON;  $n = 6$ ). Two groups of rats chronically stressed by cold water immersion were given supplementation with vegetable oil as a placebo (STR PL;  $n = 9$ ) or vitamin D<sub>3</sub> (STR SUP;  $n = 9$ ). The last group comprised sham-stressed (warm water-immersed) rats (SHM;  $n = 6$ ).

The STR PL and STR SUP groups were exposed over 28 days to chronic stress by isolation in the glass box (21 × 15 × 30 cm) for 1 hour per day with a 1-cm-deep ice/water mixture (0–4 °C), and the SHM group was placed in sham stress conditions (warm water (35 °C)). The animals from the STR PL and DEX PL groups received oral administration of the vegetable oil as a placebo, and the STR SUP and DEX SUP groups were supplemented with vitamin D<sub>3</sub> at 600 IU/kg (Juvit D3, PPF HASCO-LEK. SA., Poland) for 28 consecutive days.

## 2.3. Blood Collection

Blood was collected at 2-time points, prior to and after 28 days of the experiment. Blood was taken from the tail vein during isoflurane anesthesia. Samples were centrifuged at 2000×  $g$  for 10 min at 4 °C. Serum samples were separated and stored at –80 °C until later analysis.

## 2.4. Tissue Collection

Soleus, extensor digitorum longus, gastrocnemius, tibialis anterior, and quadriceps femoris muscles were collected from both hind limbs, weighed, and snap-frozen in liquid nitrogen and kept at –80 °C for later analysis. The heart, liver, spleen, and thymus were excised and weighed immediately after sacrifice.

## 2.5. Biochemical Analysis

### 2.5.1. Corticosterone Level

According to the manufacturer's instructions, the plasma corticosterone level was determined with a Corticosterone rat/mouse ELISA Kit (DEV9922, Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany). The concentration of CORT was expressed in nanograms per milliliter of plasma.

### 2.5.2. Vitamin D-25(OH)D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>2</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Levels

Analysis of the vitamin D<sub>3</sub> metabolite levels was performed using the isotope dilution method by the liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry technique (LC-MS/MS). Samples were prepared and analyzed using the Eksigent ExionLC analytical HPLC system with a CTC PAL autosampler (Zwinger, Switzerland) coupled with QTRAP<sup>®</sup> 4500 MS/MS system (Sciex, Framingham, MA, USA) according to the procedure described previously [23].

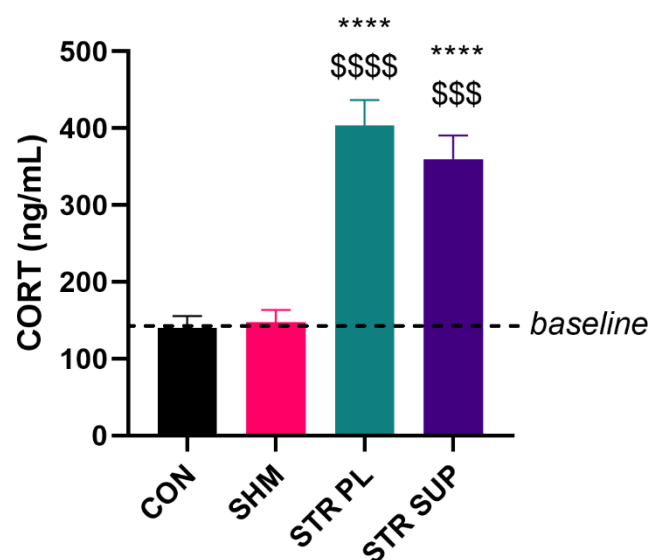
## 2.6. Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8.3 software program (GraphPad Software, CA, USA). The results are expressed as mean ± SD. The differences between groups were tested using one-way ANOVA followed by the Tukey post-hoc test;  $p$ -values less than 0.05 were considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Plasma Corticosterone (CORT) Level

As was expected, cold water immersion treatment caused a significant induction in hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis activation and a CORT surge into the blood flow. Plasma CORT level significantly increased in both (placebo and supplemented) stressed groups of rats. The levels were  $403.54 \pm 49.73$  in the stressed placebo (STR PL) and  $359.67 \pm 46.32$  ng/mL in the stressed supplemented with vitamin D<sub>3</sub> (STR SUP) groups, respectively. There were no differences from the baseline in the control sham-stressed (SHM) rats. In order to assess the correctness of the selection of sham stress conditions, we also determined the CORT level in the control (CON) group, and no changes in that group were observed (Figure 1).

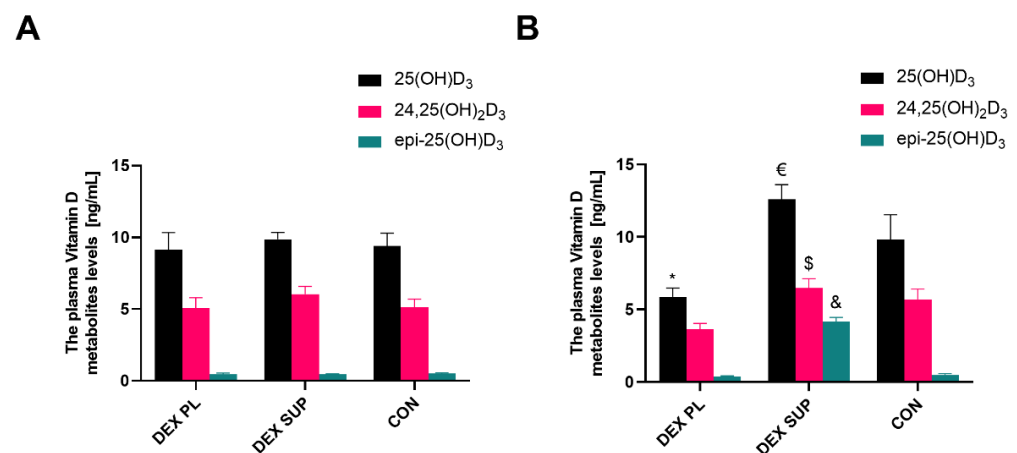


**Figure 1.** The level of corticosterone (CORT) in plasma. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. CON ( $n = 6$ ), SHM ( $n = 6$ ), STR PL ( $n = 9$ ), STR SUP ( $n = 9$ ), \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. CON, \$\$\$\$  $p < 0.0001$  vs. SHM, \$\$\$  $p < 0.001$  vs. SHM. CON: control group; SHM: sham cold water immersion group; STR PL: cold water immersion group supplemented with placebo; STR SUP: cold water immersion group supplemented with vitamin D<sub>3</sub>.

#### 3.2. Vitamin D Biochemical Analysis

##### 3.2.1. Plasma Vitamin D<sub>3</sub> Metabolite Levels in DEX-Treated Rats

After four weeks of the experiment, the level of 25(OH)D<sub>3</sub> significantly differed between the groups. As we expected, the highest concentration of 25(OH)D<sub>3</sub> was observed in the supplemented group. However, the dexamethasone-treated supplemented with vitamin D<sub>3</sub> (DEX SUP) group differed only from the dexamethasone-treated placebo (DEX PL) group, not from the CON group (the values were  $12.59 \pm 2.87$  in the DEX SUP,  $5.87 \pm 1.62$  in the DEX PL, and  $9.85 \pm 4.12$  ng/mL in the CON groups, respectively) (Figure 2B).



**Figure 2.** The plasma vitamin D metabolite levels in DEX-treated rats at baseline (A) and the end of the experiment (B). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. DEX PL ( $n = 7$ ), DEX SUP ( $n = 8$ ), CON ( $n = 6$ ), \*  $p < 0.05$  vs. CON, \$  $p < 0.01$  vs. DEX PL, €  $p < 0.001$  vs. DEX PL, &  $p < 0.0001$  vs. DEX PL; vs. CON. DEX PL: dexamethasone-treated group supplemented with placebo; DEX SUP: dexamethasone-treated group supplemented with vitamin D<sub>3</sub>; CON: control group.

In the CON group within the experiment, the results were relatively homogeneous and transparent. No changes were observed in either 25(OH)D<sub>3</sub> or 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> during the experiment, proving the correct blinding in the group and the lack of vitamins D<sub>3</sub> or D<sub>2</sub> in the feed.

In the DEX PL group we observed a significant reduction in the bioavailable form of vitamin D<sub>3</sub>-25(OH)D<sub>3</sub>. Besides, no catabolic mechanisms were activated: the values for epi-25(OH)D<sub>3</sub> and 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> were lower, but their ratio to 25(OH)D<sub>3</sub> remained practically unchanged between time points. This could reflect a clinical case of high demand for vitamin D<sub>3</sub> and its heavy consumption to defend muscles against atrophy. Circulating 25(OH)D<sub>3</sub> is absorbed first. The rapid mobilization of vitamin D<sub>3</sub> from the body's fat reserves is not visible here. The appearance of a large pool of endogenous vitamin D<sub>3</sub> would be manifested in changes in the ratio of 25(OH)D<sub>3</sub> to epi-25(OH)D<sub>3</sub> and 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, respectively (as in the DEX SUP group, where vitamin D<sub>3</sub> was obtained exogenously) (Table 1).

**Table 1.** The 25(OH)D<sub>3</sub> and its metabolite ratios at baseline and the end of the experiment in DEX-treated rats.

| Group               | 25(OH)D <sub>3</sub> : 24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> Ratio |                 | 25(OH)D <sub>3</sub> : epi-25(OH)D <sub>3</sub> Ratio |                    |
|---------------------|--|-----------------|---|--------------------|
|                     | Baseline   | after           | Baseline  | after              |
| DEX PL ( $n = 7$ )  | 1.83 $\pm$ 0.18  | 1.65 $\pm$ 0.30 | 20.27 $\pm$ 3.08                                      | 16.04 $\pm$ 2.51 * |
| DEX SUP ( $n = 8$ ) | 1.70 $\pm$ 0.40  | 2.17 $\pm$ 1.00 | 21.97 $\pm$ 3.22                                      | 3.11 $\pm$ 0.88 #  |
| CON ( $n = 6$ )     | 1.88 $\pm$ 0.48  | 1.68 $\pm$ 0.30 | 20.33 $\pm$ 6.17                                      | 20.62 $\pm$ 4.63   |

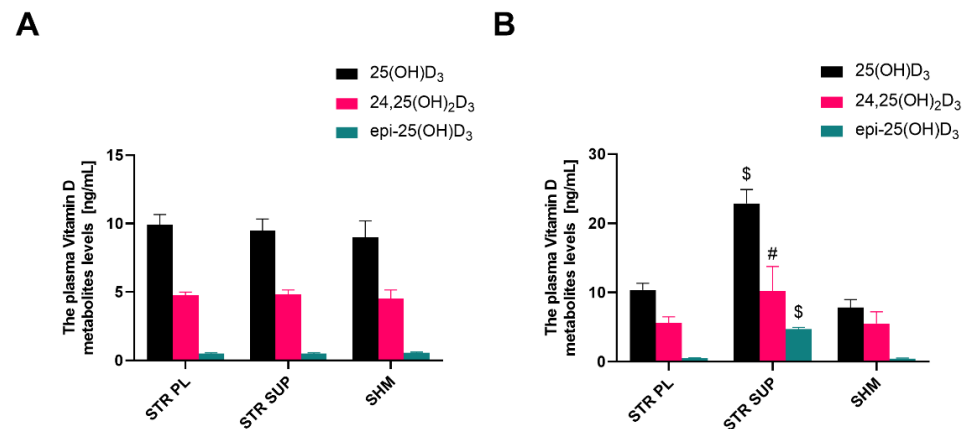
Results are expressed as mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs. CON, #  $p < 0.0001$  vs. DEX PL; vs. CON.

Additionally, the lack of an increase in 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and significant changes in the 25(OH)D<sub>3</sub>:24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ratio, which works on the principle of feedback with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, supports the thesis that a rapid “on-going” consumption of bioavailable vitamin D<sub>3</sub> to protect against muscle atrophy in that particular group occurred (Table 1).

### 3.2.2. Plasma Vitamin D<sub>3</sub> Metabolite Levels in Stressed Rats

Similar to the DEX-treated rats, a significantly higher concentration of 25(OH)D<sub>3</sub> was observed only in supplemented group (22.89  $\pm$  6.02) as compared with the STR PL (10.36  $\pm$  2.92) and the SHM groups (7.84  $\pm$  2.80 ng/mL). In addition, there was no effect of warm water immersion on native vitamin D<sub>3</sub> concentration and metabolism. Additionally,

in the STR PL group, the results were the same as for the SHM groups. This also means that cold water immersion had no effect on native vitamin D<sub>3</sub> concentration and metabolism (Figure 3B).



**Figure 3.** The plasma vitamin D metabolite levels in stressed rats at baseline (A) and the end of the experiment (B). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. STR PL ( $n = 9$ ), STR SUP ( $n = 9$ ), SHM ( $n = 6$ ), #  $p < 0.01$  vs. STR PL; vs. SHM, \$  $p < 0.0001$  vs. STR PL; vs. SHM. STR PL: cold water immersion group supplemented with placebo; STR SUP: cold water immersion group supplemented with vitamin D<sub>3</sub>; SHM: sham cold water immersion group.

Considering the above, the STR SUP group may be treated as a positive control of vitamin D<sub>3</sub> supplementation. A fully statistically significant increase in both 25(OH)D<sub>3</sub>, epi-25(OH)D<sub>3</sub>, and 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> shows that the body responds correctly to the supplementation. A particularly clear difference is visible for epi-25(OH)D<sub>3</sub>, and the 25(OH)D<sub>3</sub>:epi-25(OH)D<sub>3</sub> ratio. It is worth noting that in rodents (unlike humans), epimerization is the main “default” path of catabolism in response to exogenous vitamin D<sub>3</sub> (Table 2).

**Table 2.** The 25(OH)D<sub>3</sub> and its metabolite ratios at baseline and the end of the experiment in stressed rats.

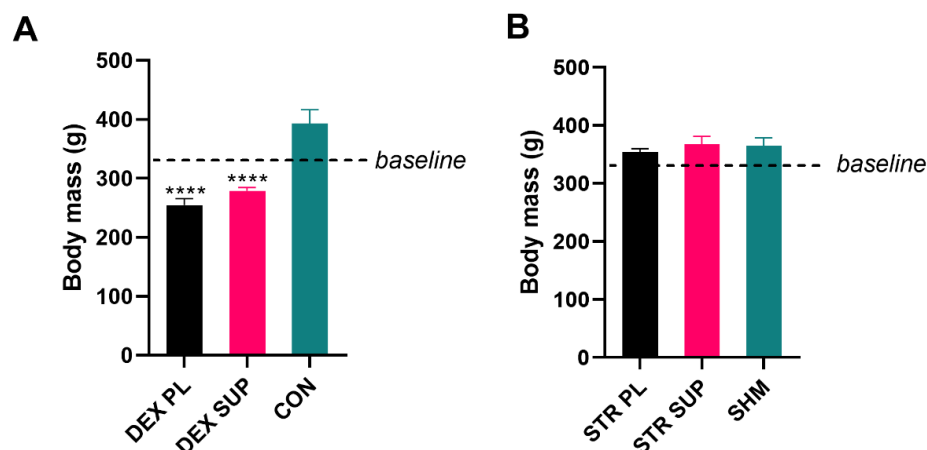
| Group               | 25(OH)D <sub>3</sub> : 24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> Ratio |                   | 25(OH)D <sub>3</sub> : epi-25(OH)D <sub>3</sub> Ratio |                    |
|---------------------|--|-------------------|---|--------------------|
|                     | Baseline   | after             | Baseline  | after              |
| STR PL ( $n = 9$ )  | 2.10 $\pm$ 0.40  | 1.82 $\pm$ 0.36   | 20.20 $\pm$ 3.21                                      | 20.63 $\pm$ 1.75   |
| STR SUP ( $n = 9$ ) | 1.94 $\pm$ 0.23  | 2.43 $\pm$ 0.92 & | 19.34 $\pm$ 2.71                                      | 4.96 $\pm$ 1.34 \$ |
| SHM ( $n = 6$ )     | 1.99 $\pm$ 0.22  | 1.40 $\pm$ 0.21   | 16.88 $\pm$ 3.79                                      | 17.25 $\pm$ 4.99   |

Results are expressed as mean  $\pm$  SD, &  $p < 0.01$  vs. SHM, \$  $p < 0.0001$  vs. STR PL; vs. SHM.

### 3.3. Morphological Analysis

#### 3.3.1. Body and Skeletal Muscle Mass in DEX-Treated Rats

The DEX-treated groups presented weight loss throughout the experiment as compared with the CON group (Figure 4A).



**Figure 4.** The body mass at the end of the experiment in DEX-treated (A), and stressed (B) rats. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. DEX PL ( $n = 7$ ), DEX SUP ( $n = 8$ ), CON ( $n = 6$ ), STR PL ( $n = 9$ ), STR SUP ( $n = 9$ ), SHM ( $n = 6$ ), \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. CON. DEX PL: dexamethasone-treated group supplemented with placebo; DEX SUP: dexamethasone-treated group supplemented with vitamin D<sub>3</sub>; CON: control group; STR PL: cold water immersion group supplemented with placebo; STR SUP: cold water immersion group supplemented with vitamin D<sub>3</sub>; SHM: sham cold water immersion group.

To investigate skeletal muscle loss, the weights of the soleus (SOL), extensor digitorum longus (EDL) (Figure 5A,B), tibialis anterior, gastrocnemius, and quadriceps femoris muscles were measured immediately after excision (Table 3). Although supplementation with vitamin D<sub>3</sub> did not prevent this DEX-induced body mass loss, we found statistically significant differences in SOL muscle mass between the DEX PL and the DEX SUP groups ( $122 \pm 15$ , and  $149 \pm 9$  mg, respectively;  $p < 0.05$ ). Additionally, there was no difference between the DEX SUP and the CON group (Figure 5A).

**Table 3.** Body and skeletal muscles mass at the end of the experiment in DEX-treated rats.

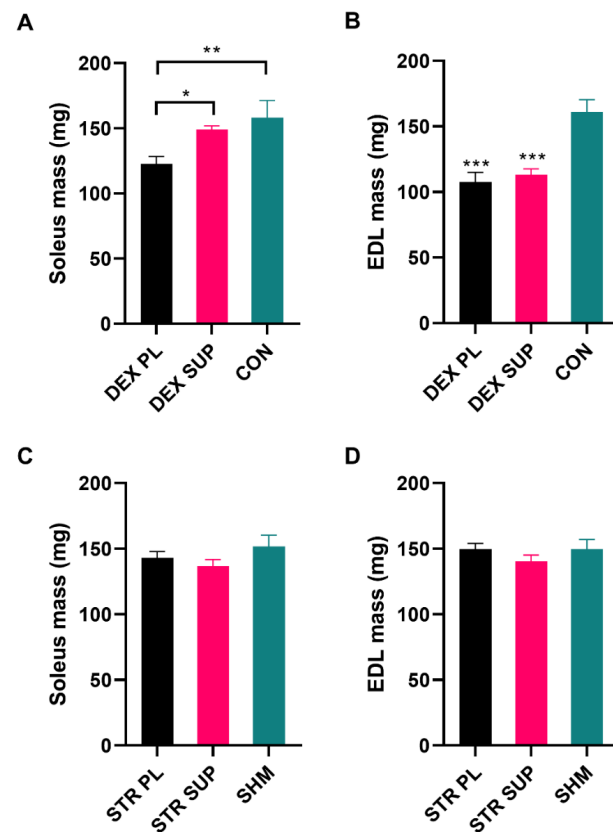
| Group               | Basal Body Mass (g) | Final Body Mass (g)   | Tibialis Anterior (g) | Gastrocnemius (g)  | Quadriceps Femoris (g) |
|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|
| DEX PL ( $n = 7$ )  | $332.57 \pm 23.62$  | $254.86 \pm 28.06$ \$ | $0.39 \pm 0.11$ \$    | $1.28 \pm 0.20$ \$ | $1.41 \pm 0.24$ \$     |
| DEX SUP ( $n = 8$ ) | $337.38 \pm 24.54$  | $279.13 \pm 14.55$ \$ | $0.46 \pm 0.04$ \$    | $1.42 \pm 0.16$ \$ | $1.58 \pm 0.26$ \$     |
| CON ( $n = 6$ )     | $335.60 \pm 48.20$  | $393.00 \pm 52.05$    | $0.75 \pm 0.05$       | $2.24 \pm 0.18$    | $2.44 \pm 0.29$        |

Results are expressed as mean  $\pm$  SD. \$  $p < 0.0001$  vs. CON.

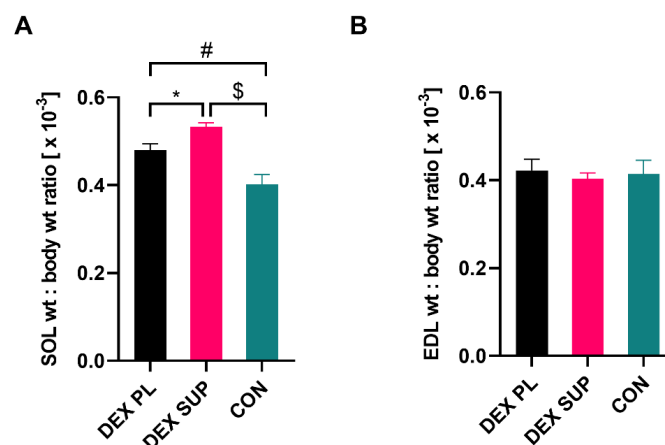
Regarding the EDL, we observed a significant reduction in muscle mass in both DEX-treated groups compared with the CON group ( $107 \pm 19$  DEX PL,  $113 \pm 13$  DEX SUP, and  $161 \pm 21$  mg CON, respectively;  $p < 0.001$ ). Nevertheless, there were no differences between the supplemented and placebo groups. These results suggest that vitamin D<sub>3</sub> supplementation influences DEX-induced muscle loss, but only in red, not white muscle, and may preserve red muscle against the chronic DEX-induced muscle loss. The masses of the other muscles were consistent and homogeneous. There was a clear and highly statistically significant reduction in all muscle mass in both DEX-treated groups regardless of supplementation with vitamin D<sub>3</sub> or placebo.

No significant difference was found in the muscle:body weight ratios of CON and DEX-treated rats in EDL (Figure 6B). However, the SOL muscle weight to body weight ratio significantly increased in DEX-treated rats compared to the CON group (Figure 6A). This showed not only that there was a relative sparing of SOL muscles as compared with EDL within the experiment, but also sparing of muscle tissue in general relative to other body components. In particular, SOL sparing affected the DEX SUP group, suggesting a protective role of vitamin D<sub>3</sub> supplementation.





**Figure 5.** The SOL and EDL muscles mass at the end of the experiment in DEX-treated (A,B), and stressed (C,D) rats. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. DEX PL ( $n = 7$ ), DEX SUP ( $n = 8$ ), CON ( $n = 6$ ), STR PL ( $n = 9$ ), STR SUP ( $n = 9$ ), SHM ( $n = 6$ ), \*  $p < 0.05$  vs. DEX SUP, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. CON. DEX PL: dexamethasone-treated group supplemented with placebo; DEX SUP: dexamethasone-treated group supplemented with vitamin D<sub>3</sub>; CON: control group; STR PL: cold water immersion group supplemented with placebo; STR SUP: cold water immersion group supplemented with vitamin D<sub>3</sub>; SHM: sham cold water immersion group.



**Figure 6.** Mean muscle weight: body weights ratio in DEX-treated rats in SOL (A), and EDL (B). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. DEX PL ( $n = 7$ ), DEX SUP ( $n = 8$ ), CON ( $n = 6$ ), \*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$ , \$  $p < 0.0001$ . DEX PL: dexamethasone-treated group supplemented with placebo; DEX SUP: dexamethasone-treated group supplemented with vitamin D<sub>3</sub>; CON: control group; EDL: extensor digitorum longus; SOL: soleus.

### 3.3.2. Body and Skeletal Muscle Mass in Stressed Rats

Interestingly, despite highly statistically significant CORT release (Figure 1), we did not observe body weight changes in the group of rats subjected to cold water immersion (Figure 4B). Furthermore, no statistically significant differences were observed between the groups in SOL ( $143 \pm 15$ ,  $136 \pm 16$ , and  $152 \pm 21$  mg in the STR PL, STR SUP, and SHM groups, respectively) and EDL (STR PL  $149 \pm 13$ , STR SUP  $140 \pm 15$ , SHM  $149 \pm 18$  mg) muscle mass (Figure 5C,D).

Although we did not observe any statistically significant differences between groups in stressed rats with regard to muscle mass (Table 4), as opposed to the DEX SUP group, stressed rats supplemented with vitamin D<sub>3</sub> had the lowest (statistically insignificant) ratios in both muscles among groups (Table 5). Considering the lack of body reduction in stressed groups, that result supports the thesis that the used stress model promotes adipose tissue gain (in turn, an enlarged adipose mass may serve as a reservoir for vitamin D).

**Table 4.** Body and skeletal muscle mass at the end of the experiment in stressed rats.

| Group                   | Basal Body Mass (g) | Final Body Mass (g) | Tibialis Anterior (g) | Gastrocnemius (g) | Quadriceps Femoris (g) |
|-------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|------------------------|
| STR PL ( <i>n</i> = 9)  | 324.44 ± 22.10      | 353.89 ± 17.32      | 0.69 ± 0.05           | 2.10 ± 0.16       | 2.71 ± 0.29            |
| STR SUP ( <i>n</i> = 9) | 337.78 ± 41.77      | 367.67 ± 40.43      | 0.67 ± 0.07           | 2.15 ± 0.25       | 2.70 ± 0.45            |
| SHM ( <i>n</i> = 6)     | 329.00 ± 33.66      | 364.83 ± 33.52      | 0.71 ± 0.07           | 2.16 ± 0.33       | 2.79 ± 0.48            |

Results are expressed as mean ± SD.

**Table 5.** Mean muscle weight: body weights ratio in stressed rats.

| Group                   | SOL Weight: Body Weight Ratio ( $\times 10^{-3}$ ) | EDL Weight: Body Weight Ratio ( $\times 10^{-3}$ ) |
|-------------------------|--|--|
| STR PL ( <i>n</i> = 9)  | 0.403 ± 0.036                                      | 0.423 ± 0.039                                      |
| STR SUP ( <i>n</i> = 9) | 0.374 ± 0.048                                      | 0.383 ± 0.038                                      |
| SHM ( <i>n</i> = 6)     | 0.415 ± 0.035                                      | 0.410 ± 0.050                                      |

Results are expressed as mean ± SD.

### 3.3.3. Internal Organ Mass in DEX-Treated Rats

Heart and liver weights did not differ significantly between groups. Nevertheless, differences in the weight of the organs of the lymphatic system were observed. Thus, spleen weight was the lowest of the two DEX-treated groups. Besides, there was a statistically significant reduction in thymus weight in both DEX-treated groups compared to the control group ( $0.090 \pm 0.053$ ,  $0.148 \pm 0.091$  vs.  $0.372 \pm 0.054$  g in the DEX PL, DEX SUP, and CON group, respectively) (Table 6).

**Table 6.** Internal organ mass at the end of the experiment in DEX-treated rats.

| Group                   | Heart (g)   | Liver (g)    | Spleen (g)     | Thymus (g)       |
|-------------------------|-------------|--------------|----------------|------------------|
| DEX PL ( <i>n</i> = 7)  | 0.83 ± 0.11 | 10.26 ± 0.93 | 0.25 ± 0.04 \$ | 0.090 ± 0.053 \$ |
| DEX SUP ( <i>n</i> = 8) | 0.92 ± 0.09 | 11.08 ± 1.34 | 0.30 ± 0.03 \$ | 0.148 ± 0.091 #  |
| CON ( <i>n</i> = 6)     | 0.92 ± 0.10 | 11.88 ± 2.16 | 0.65 ± 0.06    | 0.372 ± 0.054    |

Results are expressed as mean ± SD, # *p* < 0.001 vs. CON, \$ *p* < 0.0001 vs. CON.

### 3.3.4. Internal Organs Mass in Stressed Rats

Similarly to DEX-treated groups, in stressed rats we did not observe any statistically significant changes in heart and liver mass. Nevertheless, we observed significantly lower thymus weight in the stressed animals treated with placebo, but not in the vitamin D<sub>3</sub>-supplemented group compared with the SHM group ( $0.233 \pm 0.045$  in the STR PL,  $0.305 \pm 0.101$  in the STR SUP, and  $0.348 \pm 0.082$  g in the SHM groups, respectively; *p* < 0.05), which suggest that vitamin D<sub>3</sub> supplementation may protect thymus against degeneration caused by GCs, particularly in the chronic stress condition (Table 7).

**Table 7.** Internal organs mass at the end of the experiment in stressed rats.

| Group                   | Heart (g)   | Liver (g)    | Spleen (g)  | Thymus (g)      |
|-------------------------|-------------|--------------|-------------|-----------------|
| STR PL ( <i>n</i> = 9)  | 0.94 ± 0.05 | 11.22 ± 0.77 | 0.63 ± 0.08 | 0.233 ± 0.045 * |
| STR SUP ( <i>n</i> = 9) | 0.95 ± 0.06 | 10.77 ± 1.31 | 0.66 ± 0.07 | 0.305 ± 0.101   |
| SHM ( <i>n</i> = 6)     | 0.89 ± 0.09 | 11.48 ± 1.46 | 0.60 ± 0.11 | 0.348 ± 0.082   |

Results are expressed as mean ± SD. \* *p* < 0.05 vs. SHM.

#### 4. Discussion

The role of vitamin D<sub>3</sub> within the skeletal muscle is in the scope of interest of many researchers. Although the beneficial effect of vitamin D<sub>3</sub> on skeletal muscle mass remains unclear, some research suggests that vitamin D<sub>3</sub> may prevent skeletal muscle loss and atrophy [24], while other papers indicate that vitamin D<sub>3</sub> supplementation has little or no effect on muscle mass [12,13]. We found that chronic DEX treatment decreased serum 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations. We also showed that GC-induced body and muscle loss are presented only in exogenously administered DEX. Our results indicate that DEX-induced muscle loss is abolished in rats supplemented with vitamin D<sub>3</sub> but only in SOL muscle. Based on previously published data [25], we assumed that a similar effect should be observed in the CSR conditions. However, instead of HPA axis activation and CORT surge, we did not note any changes in the body and muscle weight. Moreover, the cold water immersion had no effect on the native vitamin D<sub>3</sub> levels despite the highly and statistically significant elevated level of circulating CORT in stressed rats.

##### 4.1. Chronic Stress Response and Its Effect on the Body, Skeletal Muscle, and Organ Mass

The chronic stress response model used in the experiment was based on the procedure that combines physical (low temperature) and psychological stress (impossibility to escape and isolation). The obtained data show that the CSR was successfully induced, and the level of circulating CORT level highly increased from the baseline compared to the SHM and CON groups. The CORT concentration at 400 ng/mL levels corresponded with the results obtained in our other CSR experiment [26] and with the works based on the cold water immersion model [27,28].

Despite the physiologically significant CORT surge, we did not observe any body and muscle weight changes in the supplemented and placebo groups. Interestingly, in an experiment conducted by Nishida and coworkers, no changes in SOL and EDL muscle mass were observed even during DEX treatment (5 days, dose 600 µg/kg) [29]. Our recent work [25,26] showed that the CSR and increased CORT level do not have to accompany changes in body and muscle weight (data not shown); nevertheless, an increased level of atrogin-1 was observed. Furthermore, we assume that to explain this phenomenon in these particular conditions, it is necessary to consider intramuscular fat stores in rats from groups exposed to the chronic cold water immersion [30,31]. In support of this thesis, we can mention that, during autopsy, an increased amount of total fat mass and adipose tissue browning in two reference points (the suprascapular and supraspinal areas) was observed [32] (data not shown).

Lastly, the classically indicated “stress triad” (a term proposed by Selye) assumes that in first reaction to stress there are three visible changes: adrenal enlargement, atrophy of the thymus, and hemorrhagic gastric erosions [33]. A partly similar observation was made in our study, where thymus weight significantly decreased in rats from the STR PL, while no changes in the STR SUP group were observed (Table 7).

##### 4.2. Dexamethasone Treatment and Its Effect on the Body, Skeletal Muscle, and Organ Mass

Our results show that chronic DEX administration reduced body weight in both DEX-treated groups (23% and 17% in DEX PL and DEX SUP, respectively), and supplementation with vitamin D<sub>3</sub> did not attenuate this effect in a statistically significant manner. Moreover, in line with Selye’s assumptions, thymus and spleen degradation was also observed in both DEX-treated groups. Despite the lack of bodyweight preservation in the DEX SUP group,

SOL muscle-sparing in the vitamin D<sub>3</sub> supplemented group was observed. Muscle atrophy is a major adverse effect observed after DEX administration; however, the exact mechanism responsible for DEX-induced muscle atrophy is not well understood. Some data show that DEX acts mainly on muscles containing type II fast-twitch fibers as compared with type I slow-twitch fibers [34,35]. Similar observations were made by Krug and coworkers, where DEX treatment reduced flexor hallucis longus and tibialis anterior mass without SOL mass loss [36]. Our results are only partially in line with previous observations. Chronic DEX administration caused massive muscle loss in both red and white muscles, sparing only SOL in the group supplemented with vitamin D<sub>3</sub>.

#### *4.3. The Potential Protective Role of Vitamin D<sub>3</sub> in Skeletal Muscle in GC-Induced Muscle Loss Conditions*

Our results show the massive consumption of vitamin D<sub>3</sub> in DEX-treated rats to defend muscles against atrophy, especially in the DEX PL group. Circulating 25(OH)D<sub>3</sub> was utilized first without the rapid mobilization of vitamin D<sub>3</sub> from the body's fat reserves. Furthermore, in the DEX SUP group, the rapid "on-going" consumption of circulating vitamin D<sub>3</sub> to protect against muscle atrophy was visible.

Several clinical works highlight the positive aspects of vitamin D supplementation in many diseases. According to the Endocrine Society Clinical Practice Guideline on the Prevention of Vitamin D Deficiency, concentrations of 25(OH)D<sub>3</sub> from 21 to 29 ng/mL (52.5–72.5 nmol/L) in serum are insufficient, and levels lower than 20 ng/mL (50 nmol/L) are considered to reflect deficiency [37]. As the data show, normalizing the level of circulating vitamin D enhances the reduction of systemic inflammation markers and intensity of pain in low back patients [37]. Another study shows that supplementation for six months reduced oxidative protein damage, decreased pain, improved quality of life, and improved grip strength and physical performance in osteoarthritis patients [38]. Vitamin D supplementation is also increasingly used in the prevention and therapy of sarcopenia [5,6] and neuromuscular diseases [39,40]. Moreover, studies show that vitamin D deficiency results in a more severe course of SARS-COV2 virus infection, and vitamin D supplementation is one of the proposed strategies for relieving symptoms of the disease [41]. Additionally, novel findings suggest that the early use of DEX could reduce duration of mechanical ventilation and overall mortality in patients with established moderate-to-severe acute respiratory distress syndrome (ARDS) in SARS-COV2 infected patients [42]. The low potential risk of vitamin D overdose (using the standard proposed dose appropriate to age, e.g., 2000 IU for an adult) [43,44], and the cost-effective aspect of vitamin D supplementation [45] should be considered in support of its use for the treatment of various diseases. According to knowledge about several common regulatory pathways which vitamin D and DEX share [46], using these therapeutics in combination may prove to be the most effective known strategy against SARS-COV and also other diseases (i.e., rheumatoid arthritis [22]) due to improved function of the immune system and minimized side effects of DEX-treatment.

However, the mechanism of vitamin D-mediated changes in skeletal muscle is not fully elucidated. It is known that vitamin D<sub>3</sub> acts mainly via specific binding to an intracellular VDR, interacting with specific nucleotide sequences of over 60 target genes [47]. Numerous data show that the interaction between GCs and VDR occurs. Therefore, in the study conducted by Hidalgo and coworkers, induction with GCs increased VDR transcription in squamous cell carcinoma VII (SCC) to the level of 4–6 fold higher compared to the control group [48].

Additionally, a novel mitochondrial localization of VDR has been described. Data show that VDR influences mitochondrial respiration reduction and serves in reprogramming in cell metabolism toward the biosynthetic pathways [49,50]. This underlines the importance of mitochondria as the hub linking the processes such as cell development and atrophy inhibition in skeletal muscles. Other studies suggest that VDR plays a fundamental regulatory role in skeletal muscle mitochondrial function [51]. Moreover, the cooperative action of vitamin D<sub>3</sub> and GCs in modulating gene expression was presented [17] which

implies the potential reduction of the adverse effects of GC excess (during vitamin D<sub>3</sub> supplementation) [52]. In our study, this phenomenon is partly confirmed because SOL muscle consists of predominantly slow-oxidative fibers, with a larger pool of mitochondria, and EDL is mainly formed of fast-glycolytic muscle fibers [53]. Our results show that in DEX-induced atrophy rats, SOL muscle is sparing in both absolute (Figure 5A) and relative values (Figure 6A). In summary, the main explanation for such a massive decrease in vitamin D concentration with partial protection against atrophy is the supposition that skeletal muscle cells overexpress VDR under both atrophy and hypertrophy conditions [54].

## 5. Conclusions

Our findings show that despite the elevated circulating CORT in cold water-immersed rats, no body and muscle weight changes were observed in either the vitamin D<sub>3</sub>-supplemented or placebo groups. We found that chronic DEX treatment decreased serum 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations, and cold water immersion had no effect on native vitamin D<sub>3</sub> levels. Moreover, body weight and muscle loss occurred concomitantly only with exogenously administered DEX. Our results indicate that DEX-induced muscle loss was abolished in rats supplemented with vitamin D<sub>3</sub>, but only concerning the SOL muscle. The massive consumption of endogenous vitamin D<sub>3</sub> was caused by an attempt to protect against muscle loss in DEX-treated rats. The additional supply of exogenous vitamin D<sub>3</sub> in the DEX SUP group supports that this rapid “on-going” utilization of circulating vitamin D<sub>3</sub> was accompanied by the protection of muscle atrophy. Our findings show that DEX treatment should be combined with vitamin D<sub>3</sub> supplementation since the long-term treatment of DEX leads to a sharp reduction in vitamin D<sub>3</sub> levels. Moreover, as a consequence, this may contribute to the adverse effects of DEX treatment alone.

### *Study Limitation*

The findings of the present study are limited because the experiments were focused on visible morphological changes and not on the mechanism(s) responsible for the effects of vitamin D<sub>3</sub> supplementation on GC-induced muscle atrophy per se. Nevertheless, we found that supplementation with vitamin D<sub>3</sub> reduced the adverse effects on muscle loss in chronic DEX-treated rats, which indicates that further studies are needed to clarify the possible molecular mechanism(s) explaining this phenomenon.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.J.K. and J.J.K.; Data curation, M.J.K.; Formal analysis, M.J.K. and J.J.K.; Funding acquisition, M.J.K.; Investigation, M.J.K., D.K., D.M., Z.M.C., M.P., K.K.-W., and K.K.; Methodology, M.J.K.; Project administration, M.J.K.; Resources, M.J.K. and D.M.; Supervision, J.J.K.; Visualization, M.J.K.; Writing—original draft, M.J.K. and J.J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Science Centre, Poland (grant number 2018/31/N/NZ7/03680).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Local Bioethics Committee in Bydgoszcz, Poland (No. 12/2019).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## Abbreviations

|               |  |
|---------------|--|
| CORT          | Corticosterone   |
| CSR           | Chronic stress response                                    |
| DEX           | Dexamethasone  |
| FOXO-1        | Forkhead box protein O1                                    |
| GCs           | Glucocorticoids  |
| HPA           | Hypothalamic–pituitary–adrenal axis                        |
| HSD11B1       | 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1            |
| VDR           | Vitamin D receptor   |
| 1,25-D3-MARRS | 1,25D3–membrane associated, rapid response steroid-binding |

## References

- Kuo, T.; Harris, C.A.; Wang, J.C. Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2013**, *380*, 79–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sapolsky, R.M.; Romero, L.M.; Munck, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 55–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Costantini, D.; Marasco, V.; Moller, A.P. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *J. Comp. Physiol. Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **2011**, *181*, 447–456. [[CrossRef](#)]
- Nakamura, S.; Sato, Y.; Kobayashi, T.; Kaneko, Y.; Ito, E.; Soma, T.; Okada, H.; Miyamoto, K.; Oya, A.; Matsumoto, M.; et al. Vitamin D protects against immobilization-induced muscle atrophy via neural crest-derived cells in mice. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Garcia, M.; Seelaender, M.; Sotiropoulos, A.; Coletti, D.; Lancha, A.H., Jr. Vitamin D, muscle recovery, sarcopenia, cachexia, and muscle atrophy. *Nutrition* **2019**, *60*, 66–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lappe, J.M.; Binkley, N. Vitamin D and Sarcopenia/Falls. *J. Clin. Densitom. Off. J. Int. Soc. Clin. Densitom.* **2015**, *18*, 478–482. [[CrossRef](#)]
- Hirose, Y.; Onishi, T.; Miura, S.; Hatazawa, Y.; Kamei, Y. Vitamin D Attenuates FOXO1-Target Atrophy Gene Expression in C2C12 Muscle Cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2018**, *64*, 229–232. [[CrossRef](#)]
- Hajiluan, G.; Abbasalizad Farhangi, M.; Nameni, G.; Shahabi, P.; Megari-Abbasi, M. Oxidative stress-induced cognitive impairment in obesity can be reversed by vitamin D administration in rats. *Nutr. Neurosci.* **2018**, *21*, 744–752. [[CrossRef](#)]
- Bhat, M.; Ismail, A. Vitamin D treatment protects against and reverses oxidative stress induced muscle proteolysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *152*, 171–179. [[CrossRef](#)]
- Dzik, K.P.; Skrobot, W.; Kaczor, K.B.; Flis, D.J.; Karnia, M.J.; Libionka, W.; Antosiewicz, J.; Kloc, W.; Kaczor, J.J. Vitamin D Deficiency Is Associated with Muscle Atrophy and Reduced Mitochondrial Function in Patients with Chronic Low Back Pain. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 6835341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dzik, K.; Skrobot, W.; Flis, D.J.; Karnia, M.; Libionka, W.; Kloc, W.; Kaczor, J.J. Vitamin D supplementation attenuates oxidative stress in paraspinal skeletal muscles in patients with low back pain. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2018**, *118*, 143–151. [[CrossRef](#)]
- Beudart, C.; Buckinx, F.; Rabenda, V.; Gillain, S.; Cavalier, E.; Slomian, J.; Petermans, J.; Reginster, J.Y.; Bruyere, O. The effects of vitamin D on skeletal muscle strength, muscle mass, and muscle power: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, 4336–4345. [[CrossRef](#)]
- Stockton, K.A.; Mengersen, K.; Paratz, J.D.; Kandiah, D.; Bennell, K.L. Effect of vitamin D supplementation on muscle strength: A systematic review and meta-analysis. *Osteoporos. Int.* **2011**, *22*, 859–871. [[CrossRef](#)]
- Giustina, A.; Bilezikian, J.P. *Vitamin D in Clinical Medicine; Front Hor Res*; Karger: Basel, Switzerland, 2018; Volume 50, p. 12.
- Kinoshita, H.; Miyakoshi, N.; Kasukawa, Y.; Sakai, S.; Shiraishi, A.; Segawa, T.; Ohuchi, K.; Fujii, M.; Sato, C.; Shimada, Y. Effects of eldcalcitol on bone and skeletal muscles in glucocorticoid-treated rats. *J. Bone Miner. Metab.* **2016**, *34*, 171–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Miyakoshi, N.; Sasaki, H.; Kasukawa, Y.; Kamo, K.; Shimada, Y. Effects of a vitamin D analog, alfacalcidol, on bone and skeletal muscle in glucocorticoid-treated rats. *Biomed Res.* **2010**, *31*, 329–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Morris, K.L.; Zemel, M.B. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulation of adipocyte glucocorticoid function. *Obes. Res.* **2005**, *13*, 670–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sun, X.; Zemel, M.B. Dietary calcium regulates ROS production in aP2-agouti transgenic mice on high-fat/high-sucrose diets. *Int. J. Obes.* **2006**, *30*, 1341–1346. [[CrossRef](#)]
- Rizvi, A.; Farhan, M.; Naseem, I.; Hadi, S.M. Calcitriol-copper interaction leads to non enzymatic, reactive oxygen species mediated DNA breakage and modulation of cellular redox scavengers in hepatocellular carcinoma. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **2016**, *21*, 997–1007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Skversky, A.L.; Kumar, J.; Abramowitz, M.K.; Kaskel, F.J.; Melamed, M.L. Association of glucocorticoid use and low 25-hydroxyvitamin D levels: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES): 2001–2006. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 3838–3845. [[CrossRef](#)]

21. Cutolo, M.; Paolino, S.; Sulli, A.; Smith, V.; Pizzorni, C.; Seriola, B. Vitamin D, steroid hormones, and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2014**, *1317*, 39–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Dankers, W.; Gonzalez-Leal, C.; Davelaar, N.; Asmawidjaja, P.S.; Mus, A.M.C.; Hazes, J.M.W.; Colin, E.M.; Lubberts, E. 1,25(OH)2D3 and dexamethasone additively suppress synovial fibroblast activation by CCR6(+) T helper memory cells and enhance the effect of tumor necrosis factor alpha blockade. *Arthritis Res. Ther.* **2018**, *20*, 212. [[CrossRef](#)]
23. Rola, R.; Kowalski, K.; Bienkowski, T.; Studzinska, S. Improved sample preparation method for fast LC-MS/MS analysis of vitamin D metabolites in serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *190*, 113529. [[CrossRef](#)]
24. Dzik, K.P.; Kaczor, J.J. Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: Oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2019**, *119*, 825–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Karnia, M.J.; Myslinska, D.; Dzik, K.P.; Flis, D.J.; Podlacha, M.; Kaczor, J.J. BST Stimulation Induces Atrophy and Changes in Aerobic Energy Metabolism in Rat Skeletal Muscles-The Biphasic Action of Endogenous Glucocorticoids. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Karnia, M.J.; Myslinska, D.; Dzik, K.P.; Flis, D.J.; Ciepiewski, Z.M.; Podlacha, M.; Kaczor, J.J. The Electrical Stimulation of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Causes Oxidative Stress in Skeletal Muscle of Rats. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 4671213. [[CrossRef](#)]
27. Eshkevari, L.; Mulrone, S.E.; Egan, R.; Lao, L. Effects of Acupuncture, RU-486 on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Chronically Stressed Adult Male Rats. *Endocrinology* **2015**, *156*, 3649–3660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Garcia-Diaz, E.C.; Gomez-Quiroz, L.E.; Arenas-Rios, E.; Aragon-Martinez, A.; Ibarra-Arias, J.A.; del Socorro, I.R.-M.M. Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **2015**, *61*, 150–160. [[CrossRef](#)]
29. Nishida, H.; Ikegami, A.; Kaneko, C.; Kakuma, H.; Nishi, H.; Tanaka, N.; Aoyama, M.; Usami, M.; Okimura, Y. Dexamethasone and BCAA Failed to Modulate Muscle Mass and mTOR Signaling in GH-Deficient Rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Carrelli, A.; Bucovsky, M.; Horst, R.; Cremers, S.; Zhang, C.; Bessler, M.; Schrope, B.; Evanko, J.; Blanco, J.; Silverberg, S.J.; et al. Vitamin D Storage in Adipose Tissue of Obese and Normal Weight Women. *J. Bone Miner. Res.* **2017**, *32*, 237–242. [[CrossRef](#)]
31. Wang, X.; Wei, D.; Song, Z.; Jiao, H.; Lin, H. Effects of fatty acid treatments on the dexamethasone-induced intramuscular lipid accumulation in chickens. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36663. [[CrossRef](#)]
32. Zhang, F.; Hao, G.; Shao, M.; Nham, K.; An, Y.; Wang, Q.; Zhu, Y.; Kusminski, C.M.; Hassan, G.; Gupta, R.K.; et al. An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 252–262.e253. [[CrossRef](#)]
33. Selye, H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* **1936**, 138. [[CrossRef](#)]
34. Cho, J.E.; Fournier, M.; Da, X.; Lewis, M.I. Time course expression of Foxo transcription factors in skeletal muscle following corticosteroid administration. *J. Appl. Physiol.* **2010**, *108*, 137–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Falduto, M.T.; Czerwinski, S.M.; Hickson, R.C. Glucocorticoid-induced muscle atrophy prevention by exercise in fast-twitch fibers. *J. Appl. Physiol.* **1990**, *69*, 1058–1062. [[CrossRef](#)]
36. Krug, A.L.; Macedo, A.G.; Zago, A.S.; Rush, J.W.; Santos, C.F.; Amaral, S.L. High-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy. *Muscle Nerve* **2016**, *53*, 779–788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Krasowska, K.; Skrobot, W.; Liedtke, E.; Sawicki, P.; Flis, D.J.; Dzik, K.P.; Libionka, W.; Kloc, W.; Kaczor, J.J. The Preoperative Supplementation With Vitamin D Attenuated Pain Intensity and Reduced the Level of Pro-inflammatory Markers in Patients After Posterior Lumbar Interbody Fusion. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Manoy, P.; Yuktanandana, P.; Tanavalee, A.; Anomasiri, W.; Ngarmukos, S.; Tanpowpong, T.; Honsawek, S. Vitamin D Supplementation Improves Quality of Life and Physical Performance in Osteoarthritis Patients. *Nutrients* **2017**, *9*, 799. [[CrossRef](#)]
39. Bell, J.M.; Shields, M.D.; Watters, J.; Hamilton, A.; Beringer, T.; Elliott, M.; Quinlivan, R.; Tirupathi, S.; Blackwood, B. Interventions to prevent and treat corticosteroid-induced osteoporosis and prevent osteoporotic fractures in Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, *1*, CD010899. [[CrossRef](#)]
40. Jagannath, V.A.; Filippini, G.; Di Pietrantonj, C.; Asokan, G.V.; Robak, E.W.; Whamond, L.; Robinson, S.A. Vitamin D for the management of multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *9*, CD008422. [[CrossRef](#)]
41. Ferder, L.; Martin Gimenez, V.M.; Inserra, F.; Tajer, C.; Antonietti, L.; Mariani, J.; Manucha, W. Vitamin D supplementation as a rational pharmacological approach in the COVID-19 pandemic. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2020**, *319*, L941–L948. [[CrossRef](#)]
42. Villar, J.; Ferrando, C.; Martinez, D.; Ambros, A.; Munoz, T.; Soler, J.A.; Aguilar, G.; Alba, F.; Gonzalez-Higueras, E.; Conesa, L.A.; et al. Dexamethasone treatment for the acute respiratory distress syndrome: A multicentre, randomised controlled trial. *Lancet. Respir. Med.* **2020**, *8*, 267–276. [[CrossRef](#)]
43. Haines, S.T.; Park, S.K. Vitamin D supplementation: What's known, what to do, and what's needed. *Pharmacotherapy* **2012**, *32*, 354–382. [[CrossRef](#)]
44. Marcinowska-Suchowierska, E.; Kupisz-Urbanska, M.; Lukaszewicz, J.; Pludowski, P.; Jones, G. Vitamin D Toxicity-A Clinical Perspective. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Mistry, N.; Hemler, E.C.; Dholakia, Y.; Bromage, S.; Shukla, A.; Dev, P.; Govekar, L.; Tipre, P.; Shah, D.; Keshavjee, S.A.; et al. Protocol for a case-control study of vitamin D status, adult multidrug-resistant tuberculosis disease and tuberculosis infection in Mumbai, India. *BMJ Open* **2020**, *10*, e039935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Navarro-Barriuso, J.; Mansilla, M.J.; Naranjo-Gomez, M.; Sanchez-Pla, A.; Quirant-Sanchez, B.; Teniente-Serra, A.; Ramo-Tello, C.; Martinez-Caceres, E.M. Comparative transcriptomic profile of tolerogenic dendritic cells differentiated with vitamin D3, dexamethasone and rapamycin. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zhang, X.; Harbeck, N.; Jeschke, U.; Doisneau-Sixou, S. Influence of vitamin D signaling on hormone receptor status and HER2 expression in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2017**, *143*, 1107–1122. [[CrossRef](#)]
48. Hidalgo, A.A.; Trump, D.L.; Johnson, C.S. Glucocorticoid regulation of the vitamin D receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *121*, 372–375. [[CrossRef](#)]
49. Ricciardi, C.J.; Bae, J.; Esposito, D.; Komarnytsky, S.; Hu, P.; Chen, J.; Zhao, L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3/vitamin D receptor suppresses brown adipocyte differentiation and mitochondrial respiration. *Eur. J. Nutr.* **2015**, *54*, 1001–1012. [[CrossRef](#)]
50. Consiglio, M.; Viano, M.; Casarin, S.; Castagnoli, C.; Pescarmona, G.; Silvagno, F. Mitochondrial and lipogenic effects of vitamin D on differentiating and proliferating human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2015**, *24*, 748–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Ashcroft, S.P.; Bass, J.J.; Kazi, A.A.; Atherton, P.J.; Philp, A. The vitamin D receptor regulates mitochondrial function in C2C12 myoblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2020**, *318*, C536–C541. [[CrossRef](#)]
52. Zhang, Y.; Leung, D.Y.; Goleva, E. Vitamin D enhances glucocorticoid action in human monocytes: Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and mediator complex subunit 14. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 14544–14553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Srikuea, R.; Hirunsai, M.; Charoenphandhu, N. Regulation of vitamin D system in skeletal muscle and resident myogenic stem cell during development, maturation, and ageing. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 8239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Bass, J.J.; Nakhuda, A.; Deane, C.S.; Brook, M.S.; Wilkinson, D.J.; Phillips, B.E.; Philp, A.; Tarum, J.; Kadi, F.; Andersen, D.; et al. Overexpression of the vitamin D receptor (VDR) induces skeletal muscle hypertrophy. *Mol. Metab.* **2020**, *42*, 101059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## 6.2. Artykuł 2

Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats

**Daria Korewo-Labelle,** Mateusz Jakub Karnia, Dorota Myślińska,  
Jan Jacek Kaczor

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES

2023, VOL.24, NO. 18:13941

<https://doi.org/10.3390/ijms241813941>

W tej pracy cytowany jako (Korewo-Labelle i wsp. 2023)

## Omówienie II artykułu

Celem drugiej pracy pt. „**Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction i Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats**” (podrozdział 7.2.) wchodzącej w skład niniejszej rozprawy, było określenie wpływu witaminy D<sub>3</sub> na aktywność szlaku sygnałowego BDNF-Akt i mitochondrialny metabolizm energetyczny w hipokampie szczura podczas długotrwałego podawania deksametazonu (DEXA). W opublikowanej pracy wykazaliśmy, że 28-dniowe traktowanie szczurów DEXA powoduje obniżenie masy hipokampa z jednoczesnym obniżeniem poziomu receptora glikokortykosteroidowego (GR). W dyskusji potwierdziliśmy, że długotrwała ekspozycja na glikokortykosteroidy (GK) powoduje obniżenie ekspresji GR. Ponadto zaobserwowaliśmy obniżenie poziomu proBDNF i pAkt, które mogłyby wyjaśniać mechanizmy utraty masy hipokampa na poziomie molekularnym. Obniżenie poziomu PGC-1 $\alpha$  oraz aktywności syntazy cytrynianowej (CS) świadczą o dysfunkcji w biogenezie mitochondriów oraz mitochondrialnym metabolizmie energetycznym na poziomie cyklu kwasu cytrynowego. Co istotne, w niniejszym badaniu wykazaliśmy modulujący wpływ witaminy D<sub>3</sub> podczas długotrwałego stosowania DEXA. Po zastosowaniu suplementacji witaminy D<sub>3</sub> zaobserwowaliśmy jej ochronny wpływ na masę hipokampa i częściowo na poziom GR, jednak ten ostatni efekt nie był istotny statystycznie. Jednakże, znaczące zmiany obserwowaliśmy w poziomie mBDNF oraz pAkt, gdzie spostrzegliśmy ich wzrost w grupie suplementowanej w porównaniu do grupy DEX. Co więcej, zaobserwowaliśmy, że suplementacja witaminą D<sub>3</sub>, również częściowo odwraca negatywne zmiany zachodzące w metabolizmie mitochondrialnym. Wykazano wzrost aktywności syntazy cytrynianowej i wyższy poziom podjednostki II oksydazy cytochromu c (kodowana przez mDNA) w grupie DEX+VD w porównaniu do grupy DEX. Z przedstawionych badań wynika, że suplementacja witaminą D<sub>3</sub> może znacząco przyczyniać się do poprawy funkcji poznawczych i procesów neuroplastyczności podczas długotrwałego stosowania DEXA.

### **6.2.1. Oświadczenia współautorów**

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka,  
Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,  
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

### Oświadczenie kandydata

W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych oświadczam, że jestem wiodącym współautorem publikacji:

1. **Korewo-Labelle, D.;** Karnia, M.J.; Myślińska, D.; Kaczor, J.J. Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13941. <https://doi.org/10.3390/ijms241813941>

W wyżej wymienionym artykule mój udział prac obejmował:

- zaprojektowanie badań przy współudziale dr Mateusza Jakuba Karnii i prof. UG, dr hab. Jana Jacka Kaczora,
- pozyskanie materiału do badań
- prace laboratoryjne
- przeprowadzenie analizy statystycznej
- interpretacja wyników badań przy wsparciu prof. UG, dr hab. Jana Jacka Kaczora
- napisanie manuskryptu

Gdańsk, 15.05.2024r.

Daria Korewo-Labelle

Gdańsk, 14.05.2024

Mateusz Jakub Karnia  
*imię i nazwisko współautora*

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, Wita  
Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

### Oświadczenie współautora

W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych Pani Darii Korewo-Labelle oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

„Korewo-Labelle, D.; Karnia, M.J.; Myślińska, D.; Kaczor, J.J. Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13941. <https://doi.org/10.3390/ijms241813941>” wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. Wpływ suplementacji witaminą D<sub>3</sub> na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie powyższego artykułu polegał na:

-przygotowaniu projektu i pozyskaniu funduszy na jego realizację, przeprowadzeniu badań, analizie statystycznej, przygotowaniu publikacji i korektach manuskryptu.

Gdańsk 15.05.2024

  
.....  
*podpis współautora*

Gdańsk, 14.05.2024

Dorota Myślińska  
imię i nazwisko współautora

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,  
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

### Oświadczenie współautora

W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych Pani Darii Korewo-Labelle oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

„Korewo-Labelle, D.; Karnia, M.J.; Myślińska, D.; Kaczor, J.J. Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13941. <https://doi.org/10.3390/ijms241813941>” wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. Wpływ suplementacji witaminą D<sub>3</sub> na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie powyższego artykułu polegał na:

-przeprowadzeniu badań, pozyskaniu materiału biologicznego, przygotowaniu publikacji i korektach manuskryptu.

Gdańsk 14.05.2024

  
.....  
podpis współautora

Gdańsk, 14.05.2024

Jan Jacek Kaczor  
*imię i nazwisko współautora*

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego,  
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk

### Oświadczenie współautora

W związku z ubieganiem się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk biologicznych Pani Darii Korewo-Labelle oświadczam, że jestem współautorem publikacji:

„Korewo-Labelle, D.; Karnia, M.J.; Myślińska, D.; Kaczor, J.J. Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 13941. <https://doi.org/10.3390/ijms241813941>” wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. Wpływ suplementacji witaminą D<sub>3</sub> na mitochondrialny metabolizm tlenowy i neuroprotekcję w szczurzym hipokampie podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie powyższego artykułu polegał na:

-przygotowaniu projektu i pozyskaniu funduszy na jego realizację, przeprowadzeniu badań, analizie statystycznej, interpretacji wyników, przygotowaniu publikacji i korektach manuskryptu.

Gdańsk

15 V 2024

  
.....  
podpis współautora



Article

# Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats

Daria Korewo-Labelle , Mateusz Jakub Karnia , Dorota Myślińska and Jan Jacek Kaczor \*

Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Gdansk, 80-308 Gdansk, Poland; daria.korewo@phdstud.ug.edu.pl (D.K.-L.); mateusz.karnia@ug.edu.pl (M.J.K.); dorota.myslinska@ug.edu.pl (D.M.)

\* Correspondence: jan.kaczor@ug.edu.pl

**Abstract:** Dexamethasone (DEXA) is a commonly used steroid drug with immunosuppressive and analgesic properties. Unfortunately, long-term exposure to DEXA severely impairs brain function. This study aimed to investigate the effects of vitamin D<sub>3</sub> supplementation during chronic DEXA treatment on neurogenesis, mitochondrial energy metabolism, protein levels involved in the BDNF-mediated Akt activity, and specific receptors in the hippocampus. We found reduced serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>), downregulated proBDNF and pAkt, dysregulated glucocorticosteroid and mineralocorticoid receptors, impaired mitochondrial biogenesis, and dysfunctional mitochondria energy metabolism in the DEXA-treated group. In contrast, supplementation with vitamin D<sub>3</sub> restored the 25(OH)D<sub>3</sub> concentration to a value close to that of the control group. There was an elevation in neurotrophic factor protein level, along with augmented activity of pAkt and increased citrate synthase activity in the hippocampus after vitamin D<sub>3</sub> administration in long-term DEXA-treated rats. Our findings demonstrate that vitamin D<sub>3</sub> supplementation plays a protective role in the hippocampus and partially mitigates the deleterious effects of long-term DEXA administration. The association between serum 25(OH)D<sub>3</sub> concentration and BDNF level in the hippocampus indicates the importance of applying vitamin D<sub>3</sub> supplementation to prevent and treat pathological conditions.

**Keywords:** glucocorticosteroids; cholecalciferol; neurogenesis; neuroprotection; energy metabolism



**Citation:** Korewo-Labelle, D.; Karnia, M.J.; Myślińska, D.; Kaczor, J.J. Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13941. <https://doi.org/10.3390/ijms241813941>

Academic Editor: Hari Shanker Sharma

Received: 2 August 2023

Revised: 2 September 2023

Accepted: 9 September 2023

Published: 11 September 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Dexamethasone (DEXA) is a synthetic glucocorticosteroid (GC) with potent and long-lasting immunosuppressive and analgesic effects. Due to these properties, DEXA is widely used in medicine for recovery after surgery, during chemotherapy, and in treating severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and autoimmune diseases [1–4].

Under natural conditions, GCs are produced by activating the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and play essential roles in neuroendocrine regulation. In addition, GCs control many physiological processes, such as carbohydrate metabolism, immune maintenance, and cardiovascular activity [5]. Moreover, GCs are responsible for normal brain function and mitochondrial energy metabolism regulation [6].

Overactivity of the HPA axis results in excessive GC secretion, adrenal hypertrophy, and atrophy of certain organs such as the thymus, spleen, and skeletal muscles [7–9]. Moreover, long-term treatment or high-dose exposure to GCs also affects the neurons, causing a reduction in mitochondrial oxidation, mitochondrial membrane potential, and calcium retention capacity in cortical neurons [10]. Furthermore, there is sufficient evidence of an association between high GC levels, psychiatric disorders, and neurodegenerative



diseases such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) [11,12], which are disorders where mitochondria play a crucial role [13]. Like prolonged stress, long-term DEXA treatment carries many adverse side effects and causes significant damage. Studies show that long-term DEXA treatment also has a negative impact on the central nervous system (CNS), including the hippocampus [14–16]. The hippocampus, a limbic system structure, appears to be particularly sensitive to the effects of GCs. High levels of GCs cause morphological, metabolic, and functional changes [17–19]. It is indicated that DEXA treatment causes changes in the differentiation [20] and morphology of neurons in the hippocampus [21]. Therefore, it may also lead to depression, mood disorders, decreased concentration, insomnia, abnormal behavior, memory deficits, and altered nervous activity [15,16]. Chronic exposure to GCs may negatively affect the brain, impair hippocampal function, and reduce the volume of this brain region [22].

Moreover, some studies have also shown that excessive flow of exogenous or endogenous GCs can induce neuroplasticity in the hippocampus, mediated by a brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Chronic stress has been found to reduce BDNF in the hippocampus. Epigenetic, transcriptomic, and proteomic regulation, mediated by BDNF and/or its receptor Tropomyosin receptor kinase B (TrkB) expression, has been suggested to underlie the observed changes in rodents and humans [23,24]. Therefore, a reduction in the BDNF/TrkB signaling pathway in the hippocampus may be associated with synaptic loss, decreased neuronal plasticity, and regression network connectivity [25,26]. On the other hand, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) is a crucial mediator of brain development in both young and adult individuals [27]. It is suggested that circulating IGF-1 triggers negative feedback amplification in the HPA axis. According to Baldini et al., an increase in IGF-1 levels may be correlated with an increase in GR expression [28]. Although the effects of DEX on IGF-1 are not well understood, it has been suggested that GCs may regulate IGF-1 signaling pathways in the hippocampus [29].

The hippocampus is equipped with two types of steroid receptors: glucocorticoid (GR) and mineralocorticoid (MR) receptors [30,31]. Both receptors play a crucial role in maintaining the proper structure and function of the hippocampus. Any changes in their activity or ratio may increase the intensity of hippocampal damage [32]. Furthermore, chronic exposure to GCs may alter the expression of GR and MR or the MR/GR ratio, which may also impact mitochondrial function in the brain. Depending on the dose and/or duration of exposure, GCs may either increase or decrease the levels of MR and GR in the hippocampus, resulting in contrasting effects [32–34]. GR translocation to mitochondria directly affects their function. During long-term administration, GCs may lead to respiratory chain dysfunction, reduced ATP production, and abnormal mitochondrial biogenesis, ultimately increasing the cell sensitivity to death [34].

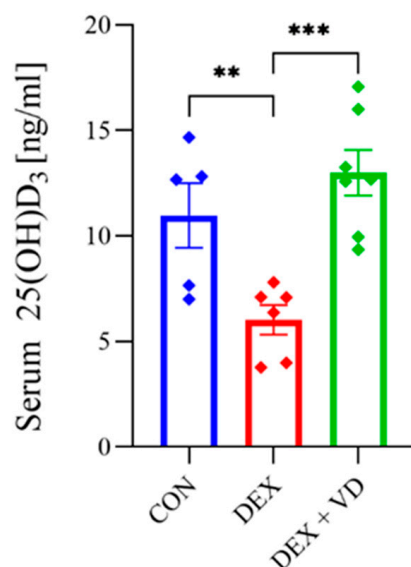
Vitamin D, known for its pleiotropic effects, regulates calcium and phosphate metabolism and cares for the skin and skeletal health, and it is also an immunomodulatory hormone [35]. The active form of vitamin D, 1,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), binds to the vitamin D receptor (VDR) and genetically regulates various cellular processes by promoting heterodimerization of this retinoid-X receptor (RXR). The activity of the VDR-RXR complex affects the gene expression of many tissues, including skeletal muscles and the brain [36]. Interestingly, VDR is also found in mitochondria, where it plays a crucial role in maintaining their integrity and proper function [37]. This characteristic is fundamental for optimal brain function and development [38]. Studies have demonstrated that excessive GC levels may induce a depression-like state and reduce the protein levels of VDR and cytochrome P450 proteins involved in vitamin D activation and catabolism in brain regions such as the hippocampus and prefrontal cortex [39,40]. Remarkably, deficiencies in vitamin D are associated with decreased hippocampal volume. However, supplementation with vitamin D<sub>3</sub> has been shown to prevent tissue atrophy and memory deficits under conditions of GC exposure [8,41,42], suggesting its potential involvement in a protective mechanism against the negative effects of stress on the brain [39].

Therefore, this study aimed to determine whether vitamin D<sub>3</sub> supplementation would positively affect the BDNF-mediated Akt activity pathway and mitochondria energy metabolism in the rat hippocampus during long-term DEXA treatment.

## 2. Results

### 2.1. Vitamin D Concentration

A 28-day treatment with DEXA reduced serum 25(OH)D<sub>3</sub> concentration in the DEX group ( $6.02 \pm 0.86$ ) compared with the CON group ( $10.97 \pm 1.71$ ;  $p < 0.01$ ). After vitamin D<sub>3</sub> supplementation, a significantly higher 25(OH)D<sub>3</sub> concentration ( $12.99 \pm 1.42$  ng/mL) was found in the DEX + VD group compared with the DEX group ( $p < 0.001$ ; Figure 1).



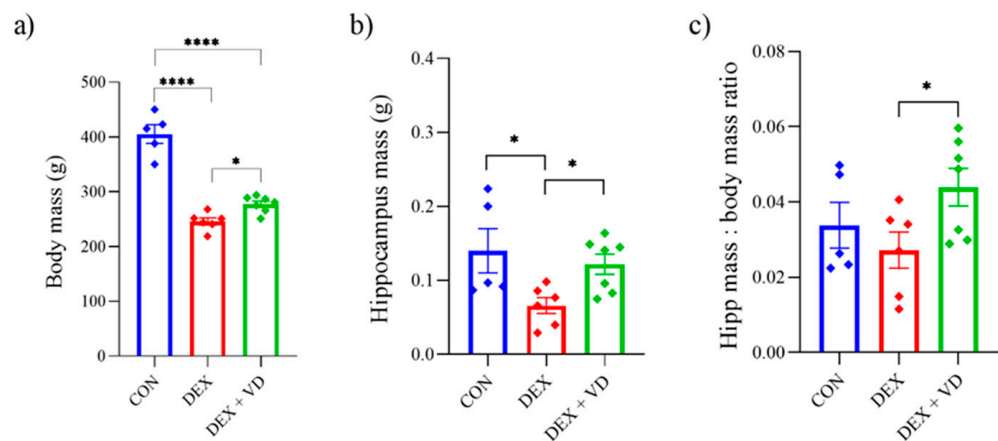
**Figure 1.** The concentration of 25(OH)D<sub>3</sub> in the serum in the control group (CON,  $n = 5$ ), the DEXA-treated group (DEX,  $n = 6$ ), and the group supplemented with vitamin D<sub>3</sub> (DEX + VD,  $n = 7$ ) after 28 days of the experiment. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 2.2. Body and Hippocampus Mass Changes

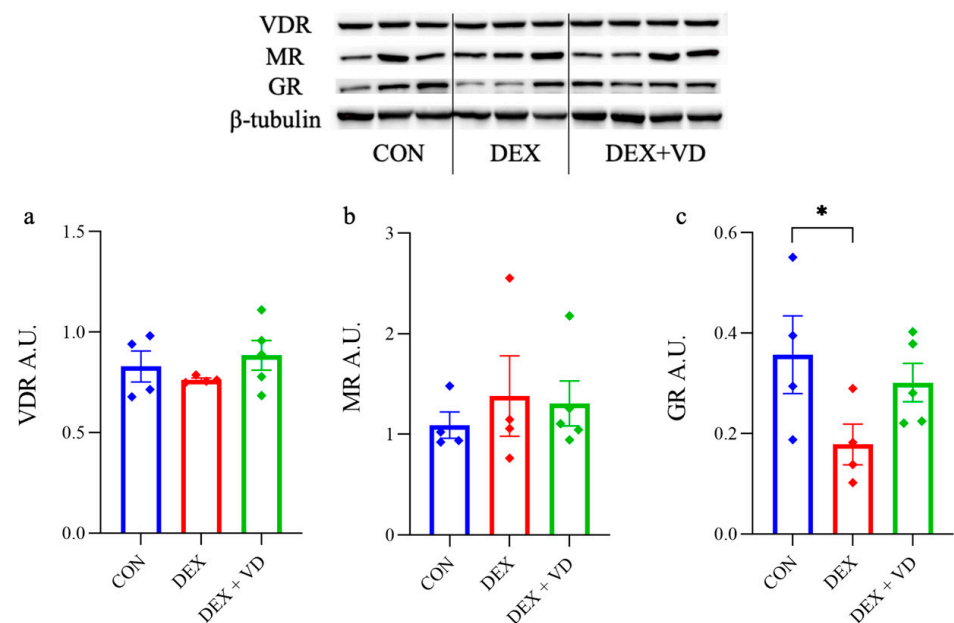
After long-term treatment of DEXA, body weight was significantly lower in both groups treated with DEXA ( $p < 0.0001$ ). The body weight of rats in the DEX group ( $245.83 \pm 8.07$  g) was significantly lower by 39% compared with the CON group ( $405.20 \pm 18.98$  g). In the DEX + VD group, body weight significantly increased by 11% ( $277.57 \pm 7.49$  g) compared with the DEX group ( $p < 0.05$ ; Figure 2a). The weight of the hippocampus in the DEX group ( $0.06 \pm 0.03$  g;  $p < 0.05$ ) decreased significantly compared with the CON group ( $0.14 \pm 0.03$ ). However, after vitamin D<sub>3</sub> supplementation in the DEX + VD group, the weight of the hippocampus ( $0.12 \pm 0.02$  g) significantly increased compared with the DEX group (Figure 2b;  $p < 0.05$ ). We also observed changes in the hippocampus/body weight ratio, where the ratio was significantly higher in the DEX + VD group ( $0.044 \pm 0.006$ ) compared with the DEX group after vitamin D<sub>3</sub> supplementation. However, we did not observe any differences in the hippocampus/body weight ratio in the DEX group ( $0.027 \pm 0.006$ ) compared to the CON group ( $0.034 \pm 0.007$ ) (Figure 2c).

### 2.3. Hippocampal GR, MR, and VDR Levels

After 28 days of DEXA treatment, no significant differences in VDR and MR protein levels were observed (Figure 3a,b). We found a statistically significant reduction in the GR protein level by 50% in the DEX group compared with the CON ( $p < 0.05$ ), but no changes were found in the DEX + VD group or between groups. However, a trend suggesting an increase in GR level was observed in the DEX + VD group versus the DEX group ( $p = 0.063$ ; Figure 3c).



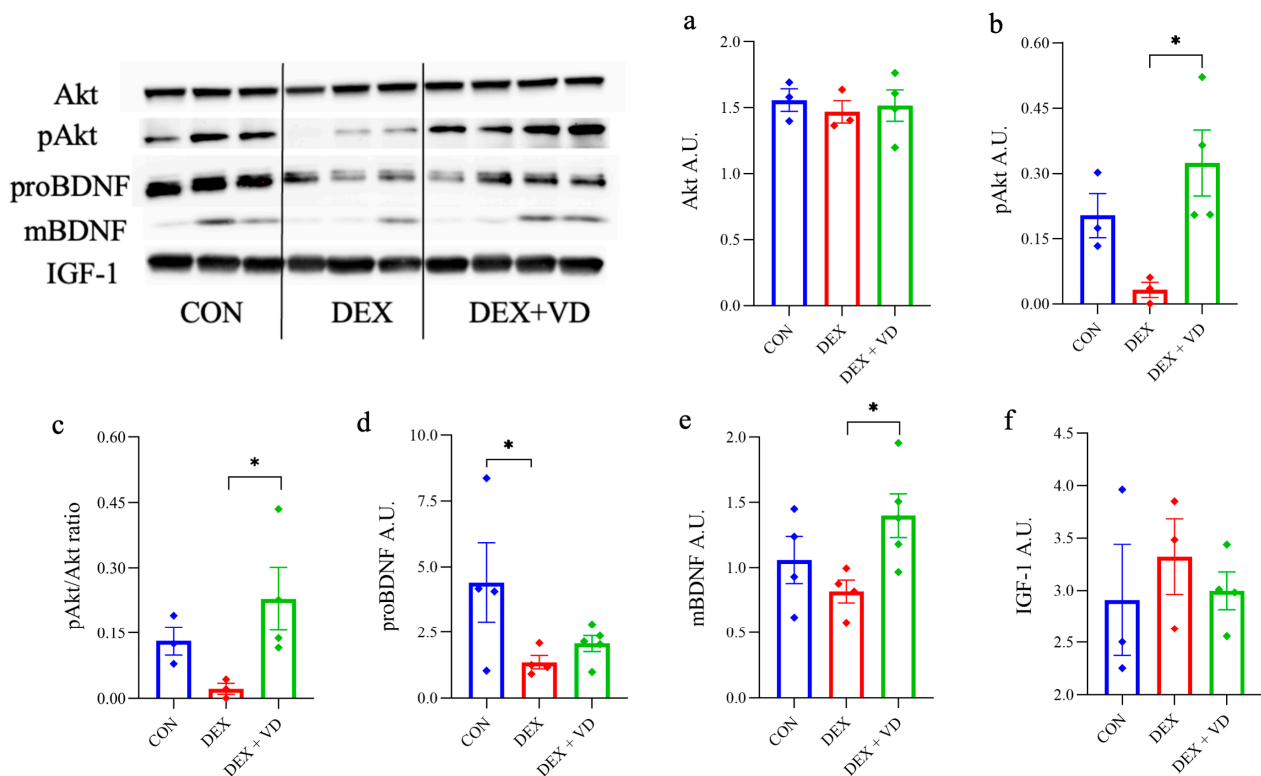
**Figure 2.** The body weight (a), hippocampus mass (b), and the hippocampus to body mass ratio (c) of rats in the CON ( $n = 5$ ), DEX ( $n = 6$ ), and DEX + VD ( $n = 7$ ) groups. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



**Figure 3.** The protein levels of VDR (a), MR (b), and GR (c) in the hippocampus of rats in the control group (CON,  $n = 4$ ), the DEXA-treated group (DEX,  $n = 4$ ), and the group supplemented with vitamin D<sub>3</sub> (DEX + VD,  $n = 5$ ). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ .

#### 2.4. Assessment of BDNF-Akt Signaling Molecules

To determine the changes in prosurvival proteins in the rat hippocampus during long-term administration of DEXA, we measured the Akt protein level and phosphorylated Akt (pAkt). There were no significant changes in Akt protein levels between the groups (Figure 4a). However, the phosphorylation state of Akt (p-Akt) significantly increased in the DEX + VD group compared with the DEX group. Moreover, the p-Akt level was almost two-fold higher in the DEX + VD group compared with the CON group, but this was not statistically significant (Figure 4b). The pAkt/Akt ratio showed a significant increase in the DEX + VD group compared with the DEX group. Still, there was no significant difference between the treatment groups and the CON group (Figure 4c).

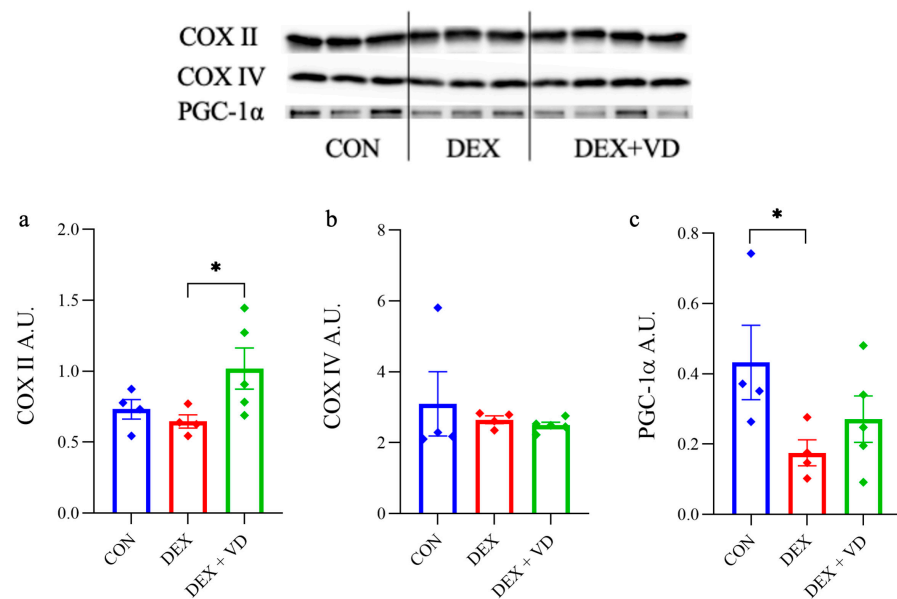


**Figure 4.** The protein levels of Akt (a), pAkt (b), proBDNF (d), mBDNF (e), and IGF-1 (f) and the pAkt/Akt ratio (c) in rat hippocampus in the control group (CON) and groups treated with DEXA and supplemented with vitamin D<sub>3</sub> (DEX + VD). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .

To evaluate neurogenesis, we measured the protein levels of the precursor of brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) and mature BDNF (mBDNF). After 28 days of DEX treatment, the level of proBDNF in the DEX group significantly decreased compared with the CON group. In contrast, we did not observe any statistically significant changes in the DEX + VD group (Figure 4d). Furthermore, we observed significantly elevated mBDNF protein levels during prolonged exposure to DEX + VD in the hippocampal tissue compared with the DEX group ( $p < 0.05$ ). This increase in mBDNF level was accompanied by an elevated phosphorylation state of Akt after vitamin D<sub>3</sub> supplementation in the rat hippocampus during long-term DEXA treatment. However, there was no significant difference in values between the DEX and CON groups (Figure 4e). We did not observe any changes in the IGF-1 protein level between the groups (Figure 4f).

### 2.5. Assessment of Mitochondrial Biogenesis and Oxidative Metabolism

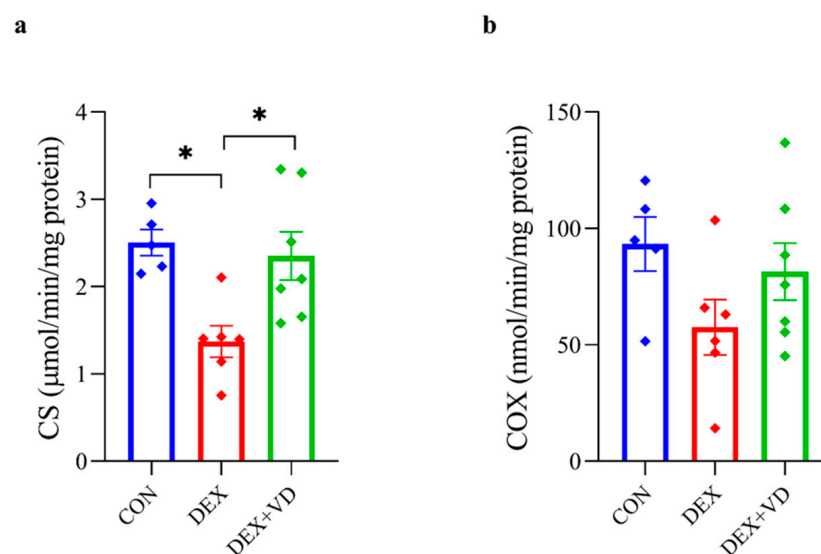
After 28 days of DEXA treatment, we found a higher level of cytochrome c oxidase subunit II coded by mitochondria (COX II) in the hippocampus in the DEX + VD group ( $1.019 \pm 0.325$ ), which increased by 37% compared with the DEX group ( $p < 0.05$ ; Figure 5a). This may partially confirm earlier studies showing the influence of vitamin D in the modulation of mitochondrial metabolism [43–45]. There were no significant changes between groups compared to the CON group ( $0.732 \pm 0.069$  A.U.). The nuclear subunit IV of cytochrome c oxidase (COX IV) protein levels was not significantly different between groups (Figure 5b). Furthermore, long-term treatment with DEXA resulted in a decrease in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ) protein level in the DEX rats when compared with the CON group. At the same time, supplementation with 600 IU of vitamin D<sub>3</sub> caused no significant changes in protein level versus the DEX + VD group (Figure 5c).



**Figure 5.** The protein levels of COX subunits (mitochondrial-II and nuclear-IV) (a,b) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α) (c) in rats from the control group (CON,  $n = 4$ ), the DEXA-treated group (DEX,  $n = 4$ ), and the group supplemented with vitamin D<sub>3</sub> (DEX + VD,  $n = 4$ ). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .

#### 2.6. Mitochondrial Oxidative Metabolism Activity

After 28 days of daily DEXA treatment, the activity of citrate synthase (CS) was reduced in the hippocampus by 48% in the DEX group ( $1.37 \pm 0.44$ ) when compared with the CON group ( $2.50 \pm 0.33$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  of protein;  $p < 0.05$ ). Moreover, CS activity was also significantly elevated by 42% in the DEX + VD group ( $2.35 \pm 0.73$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  of protein) compared with the DEX group ( $p < 0.05$ ; Figure 6a). However, we noticed no statistically significant changes in cytochrome c oxidase (COX) activity in the rat hippocampus despite a downward trend in the DEX group ( $57.53 \pm 29.14$ ) compared to CON ( $93.32 \pm 26.07$ ) and the upward trend in COX activity in the DEX + VD group ( $81.46 \pm 32.48$  nmol/min/mg of protein; Figure 6b).



**Figure 6.** The CS (a) and COX (b) activity in the hippocampus of rats from the control group (CON,  $n = 5$ ), the DEXA-treated group (DEX,  $n = 6$ ), and the group supplemented with vitamin D<sub>3</sub> (DEX + VD,  $n = 7$ ). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .

### 3. Discussion

In the present study, we showed that long-term treatment with DEXA reduced the body mass of rats, induced hippocampus atrophy, and decreased proBDNF and GR protein levels in the rat hippocampus. We also found attenuated serum concentrations of 25(OH)D<sub>3</sub> in DEXA-treated rats. Additionally, we observed a reduction in BDNF signaling in the hippocampus, a corticolimbic area in the brain. This reduction in signaling was associated with inhibited pAkt activity, decreased PGC-1 $\alpha$  protein level, and disrupted mitochondrial energy metabolism. According to our results, systematic vitamin D<sub>3</sub> supplementation partially reversed the adverse effects of DEXA. Thus, supplementation with vitamin D<sub>3</sub> led to increased body and hippocampus mass, as well as an increased hippocampus/body mass ratio in rats treated with prolonged DEXA. Furthermore, the present study showed a restoration of 25(OH)D<sub>3</sub> concentration to a value close to the control group. There was an elevation in neurotrophic factor protein level, along with augmented activity of pAkt, increased subunit II (coded by mitochondria protein level, and higher CS activity in the hippocampus of rats chronically treated with DEXA. We did not observe any changes in the protein levels of IGF-1 between the groups. This may suggest that the BDNF-mediated activity Akt is more susceptible to DEXA's negative action than the IGF signaling pathway. Our findings demonstrate that supplementation with vitamin D<sub>3</sub> plays a protective role in the corticolimbic area and partially mitigates the deleterious effects caused by long-term DEXA administration.

Our findings indicate differences in the protective effects of vitamin D between the hippocampus and body weight, the full understanding of which requires further study. One of the side effects of GC therapy is weight loss, which may manifest as osteoporosis, muscle wasting, and changes in fat composition [46,47]. The variations in the effectiveness of vitamin D<sub>3</sub> supplementation in terms of its protective role in the hippocampus versus the rest of the body seem to arise from the multifaceted impacts of DEXA on metabolism. These impacts primarily focus on reducing fat mass, inducing muscle wasting, causing intramuscular fat deposition, and leading to mitochondrial dysfunction [48,49]. The mechanism(s) of DEXA's action resemble stress responses and are associated with hormone dysregulation, insulin resistance, hepatic hexokinase inhibition, and inhibition of glucose oxidation. The consequence of subsequent exposure to GCs leads to increased lipolysis and the release of free fatty acids (FFAs) from adipose tissue and elevated proteolysis of skeletal muscle (decrease in PI3K markers, PKB/Akt, GSK3) dependent on the activation/inhibition of AMP-activated protein kinase (AMPK) by GCs. Reported evidence after 6 weeks of vitamin D<sub>3</sub> supplementation in patients with hypercortisolemia had an effect on lipid profile and insulin sensitivity but did not significantly affect baseline body weight (BMI, waist circumference) [50].

Recently, it was reported that long-term treatment with DEXA has a negative impact on the CNS [51]. Similar alterations were also observed during a chronic stress response [52]. These changes may be associated with an appropriate balance of GR and MR levels and activity, which are crucial for the proper function of the CNS. Notably, data on GR and MR levels after DEXA treatment are inconsistent. On the one hand, studies showed that long-term administration of GCs reduced GR expression, increased neuroinflammation, and caused neurodegeneration in the hippocampus [53,54]. Another study showed changes in mRNA expression in both receptors, revealing that GR was decreased while MR was increased in the hippocampus, striatum, and prefrontal cortex in DEXA-treated mice [55]. In line with this finding, our data showed similar trends in the hippocampus. On the other hand, the data reported inconsistent results regarding changes in GR and MR protein levels and gene expression in response to GCs action [10,34,56–58]. The results published by Zhe and coworkers showed that single-prolonged stress causes a reduced expression of MR and GR in CA1 of the hippocampus [32]. The differences between our results and those of other studies may be attributed to the dose and duration of GC exposure or other factors that can have different effects [10,59]. Short-term application of both high and low doses of GCs similarly affects GR in cortical neurons by increasing its mitochondrial localization,

while during long-term supply, only a high dose decreases GR levels in mitochondria and negatively affects mitochondrial function in neurons [10]. In the current study, we found a lower GR protein level after long-term DEX treatment with the protective effect of vitamin D<sub>3</sub> supplementation. Although supplementation with vitamin D<sub>3</sub> partially reversed this adverse impact, the effect was not statistically significant.

In this study, we showed that the 28-day administration of DEXA at a dose of 2 mg/kg/day caused a decrease in the serum concentration of 25(OH)D<sub>3</sub>. A previous study found that DEXA affects VDR in a GR-dependent manner by increasing *Vdr* transcripts de novo [60]. Surprisingly, we did not find any substantial differences in VDR protein levels with DEX treatment alone or combined with D<sub>3</sub> supplemented when compared to the control group. Our finding is partially in line with the report by Jiang et al. [39], which demonstrated dysregulation in vitamin D metabolism caused by a 10-day DEXA supply. The authors observed a decrease in CYP27B1, CYP24A1, and VDR expression not only in the hippocampus but also in the prefrontal cortex, heart, and kidneys. Moreover, VDR activity is essential at the cellular level for cell differentiation, cell growth, and apoptosis [61]. However, VDR silencing induces unbalanced metabolism and ultimately contributes to cytotoxicity, while VDR ablation induces many negative consequences, including mitochondrial damage and premature cell death [37]. Additionally, VDR may have an impact on the mitochondrial respiratory chain [62] by transcribing the mitochondrial (COX II) and nuclear (COX IV) subunits of cytochrome c oxidase, which are involved in ATP synthesis [37]. Our present study showed that DEXA significantly lowered the COX subunit II protein level, while vitamin D<sub>3</sub> supplementation effectively reversed this alteration. Mitochondrial subunits play a crucial role in the catalytic cycle of the enzyme, with nuclear subunits being associated with regulating enzyme activity and ensuring the structural stability of the complex [63]. In our study, we observed a reduction in COX subunit II but not COX subunit IV. In addition, we did not find any changes in COX activity. Desquiret et al. [64] reported that chronic DEXA administration leads to a decrease in the activity of the electron transport chain (ETC) complex I and II while also increasing the activity of complex IV. To determine the function of mitochondria in the Krebs cycle, we examined the activity of citrate synthase (CS). CS is an enzyme localized in the mitochondrial matrix and is used as a quantitative enzymatic marker for the presence of intact mitochondria [65,66]. Our data indicate that long-term DEXA administration decreased CS activity in the hippocampus, while vitamin D<sub>3</sub> supplementation contributed to maintaining proper enzyme activity.

According to our results, long-term treatment with DEXA reduces the activity of mitochondrial energy metabolism, while supplementation with vitamin D<sub>3</sub> restores its proper function in the hippocampus. Vitamin D shows a potential protective role and causes reverse oxidative stress-induced cognitive impairment, which was also presented by Hajiluan and coworkers [67]. This translates into our study results, wherein, in the vitamin D<sub>3</sub>-supplemented group, there was a noticeable improvement in the function of the ETC and the citric acid cycle in the hippocampus. Vitamin D<sub>3</sub> supplementation or administration of its metabolites reduces neurological damage and neurotoxicity. The detailed biochemical mechanism is still unclear, but it is known that vitamin D can act on multiple pathways, such as neuronal antioxidant pathways, immunomodulation, calcium regulation, and glutamatergic systems [68]. All these data demonstrate an antagonistic effect of vitamin D on GC activity [69]. Given that the impairment of mitochondrial function plays an important role in response to stress, brain aging, and the early stages of neurodegenerative diseases, we believe that enhancing mitochondrial brain energy metabolism with vitamin D may be an essential protective mechanism [66,70]. This study found a positive influence of vitamin D<sub>3</sub> supplementation on the BDNF protein level, i.e., a higher serum concentration of 25(OH)D<sub>3</sub> upregulated the BDNF level in the hippocampus of prolonged DEXA-treated rats. The association between serum concentration of 25(OH)D<sub>3</sub> and BDNF level in the hippocampus reported in this study may indicate the importance of improving vitamin D with supplementation, which acts as a strategy for preventing and treating cognitive decline and increasing BDNF in excessive-prolonged flow of exogenous or endogenous GCs

(chronic stress). On the one hand, Yosefian et al. reported that vitamin D<sub>3</sub> supplementation did not affect BDNF concentration in the hippocampus in animal models of depression [71]. On the other hand, another study showed that the modulation of hippocampal BDNF with vitamin D might be an effective prevention strategy against depression in animal models of depression [72].

We are very far from any speculation, but our results strongly suggest that vitamin D<sub>3</sub> supplementation may reverse the negative changes induced by long-term DEXA treatment. This reversal leads to the upregulation of BDNF and nearly restores GR protein levels. Based on previously reported results [73] and our findings, we assume the existence of crosstalk between GR and BDNF in the hippocampus. Therefore, the present study showed that the modulatory effects of vitamin D during long-term exposure to DEXA on GR restored mitochondrial function, and BDNF-mediated Akt activity reversed neuropathophysiological changes in the hippocampus. Our findings may have significant implications for neuroplastic processes, cognitive function, and several neuropsychiatric disorders. Moreover, our results provide further evidence of a key link between vitamin D and BDNF-mediated Akt activity, as well as the restoration of physiological function in the mitochondria through GR in the hippocampus. These findings may contribute to the neuroprotective and therapeutic potential (abilities) of vitamin D in patients with neuropathophysiological disorders.

This study has some limitations. First, we did not estimate TrkB, IGR, or other proteins involved in the signaling pathway, which could have directly confirmed our findings in the hippocampus of DEXA-treated rats. Second, we did not measure protein levels that can form complexes with GR, such as HSP70/90, Bcl-2, or proteins targeting mitochondria associated with chaperones that aid in their mitochondrial translocation. This would have helped to demonstrate the meaningful role of GR in the modification of mitochondria-coded protein expression. These limitations were primarily due to the lack of sufficient tissue for the analysis.

Overall, our findings showed that supplementation with vitamin D<sub>3</sub> partially reversed negative changes in the hippocampus induced with long-term DEXA treatment in rats. We observed upregulation of BDNF and nearly restored GR protein level after vitamin D<sub>3</sub> administration. Consequently, the present study demonstrated a higher activity of pAkt, elevated COX subunit II protein level, and augmented activity of CS in the hippocampus, suggesting the modulatory abilities of vitamin D during long-term exposure to DEXA. These findings have significant implications for neuroplastic processes, cognitive function, and neuropathophysiological conditions. Moreover, these findings may contribute to the understanding of the neuroprotective and therapeutic abilities of vitamin D in patients with neurophysiological disorders.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Animals

The Local Ethics Committee in Bydgoszcz, Poland (No. 10/2019), approved our animal studies. All procedures were carried out following European guidelines.

Male Wistar rats (56–70 days postnatal) weighing 300–400 g were used in this study. The animals were obtained from the Academic Experimental Animal House at the Medical University of Gdansk, Poland. The rats were housed 3–4 per cage in climate-controlled conditions (temperature: 22 ± 2 °C; humidity: 55 ± 2%) with a 12:12 h light/dark cycle and provided food and water ad libitum.

### 4.2. Experimental Procedure

The rats were habituated to the various experimental procedures daily for two weeks before the experiment began. The eighteen animals were randomly assigned to three groups: control (CON; *n* = 5), DEXA placebo (DEX; *n* = 6), and DEXA supplemented with vitamin D<sub>3</sub> (DEX + VD; *n* = 7). The experiment lasted for 28 days. Throughout this time, the CON group was treated intraperitoneally with saline, and the two other



groups were treated with dexamethasone at 2 mg/kg/day (dexamethasone D4902, DEXA, Sigma-Aldrich, St Paul, MN, USA) in the same manner. The DEX + VD group was orally supplemented with vitamin D<sub>3</sub> (Juvit D3, PPF HASCO-LEK. SA., Wrocław, Poland) at 600 IU/kg/day, and the DEX group was orally supplemented with vegetable oil as a placebo. Blood was collected on Day 1 and Day 28 of the experiment from the tail vein under isoflurane anesthesia. On Day 29 of the experiment, all animals were sacrificed using decapitation. The brains were collected, and the hippocampus was dissected, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

#### 4.3. Tissue Preparation

##### 4.3.1. Blood Collection

To determine the serum 25(OH)D<sub>3</sub> concentration, blood samples were centrifuged for 10 min at  $2000\times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$ . The serum was collected and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

##### 4.3.2. Western Blot

A part of the hippocampus was homogenized in RIPA buffer (89901; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in the presence of protease and phosphatase inhibitors (1:100; 1861280; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The 8% tissue homogenates were centrifuged at  $750\times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Then, the collected supernatant was centrifuged again at  $12,000\times g$  (10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ), aliquoted to cryogenic microfuge tubes, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

##### 4.3.3. Enzymes Activity

The rest of the hippocampi were homogenized in buffer containing 50 mM Tris-HCl (T3253; Sigma-Aldrich, USA), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (ED3SS; Sigma-Aldrich, USA), 0.5 mM DTT (443853B; VWR International; Radnor, PA, USA) pH 7.2, and 0.2% HALT protease inhibitors cocktail (P834; Sigma Aldrich, STL, USA). The 4% tissue homogenates were centrifuged at  $750\times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

#### 4.4. Vitamin D<sub>3</sub> Metabolite Concentration

The concentration of 25(OH)D<sub>3</sub> in serum was measured using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), according to the procedure of Rola and coworkers [74]. Briefly, serum was analyzed using the Eksigent Exion LC HPLC system with a CTC PAL autosampler (Zwinger, Hofstetten bei Brienz, Switzerland) coupled to a QTRAP<sup>®</sup> 4500 MS/MS system (Sciex, Framingham, MA, USA).

#### 4.5. Protein Expression

##### Western Blot Analysis

Samples (approximately 25–30  $\mu\text{g}$ ) were prepared from the collected supernatants and mixed with RIPA buffer. The protein samples were denatured with heating at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min, cooled to room temperature, and then separated into 10% and 12% mini protean TGX precast Protein Gels (4561035, 4561045; BioRad, Hercules, CA, USA). Membranes of thickness 0.2  $\mu\text{m}$  were used for semi-dry transfer. The membranes were blocked with Every Blot Blocking Buffer (12010020; BioRad, CA, USA) or 5% nonfat milk in TBST (for the determination of PGC-1 $\alpha$ ). The primary antibodies used were: VDR (ab3508; diluted 1:1000, Abcam, Cambridge, UK), MR (ab64457; diluted 1:1000, Abcam, UK), GR (ab183127; diluted 1:500, Abcam, UK), BDNF (ab108319; diluted 1:1000, Abcam, UK), Akt (C67E7; diluted 1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), pAkt (D25E6; diluted 1:1000, Cell Signaling, MA, USA), IGF-1 (ab9572; diluted 1:1000, Abcam, UK), COX II (NBP2-94364; diluted 1:1000, Novusbio, Centennial, CO, USA), COX IV (4D11-B3-E8; diluted 1:1000, Cell Signaling, MA, USA), PGC-1 $\alpha$  (ab191838; diluted 1:500, Abcam, UK), and  $\beta$ -tubulin. (AF7011; diluted 1:1000, Affinity, Beachwood, OH, USA). The membranes were treated with secondary rabbit

anti-mouse (ab6728; Abcam) and goat anti-rabbit (111-035-003; Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) antibodies (both diluted 1:1000–1:3000). The antibodies were prepared according to the instructions provided by the manufacturer. The results were visualized using Clarity Western ECL Substrate (1705061; BioRad, CA, USA) and imaged using the ChemiDoc MP imaging system (BioRad, CA, USA). Protein concentration was measured with the Pierce™ BCA protein assay method.

#### 4.6. Enzyme Activities

##### 4.6.1. Citrate synthase Activity

Citrate synthase (CS) activity was determined according to Dzik and coworkers [43]. In brief, 3  $\mu$ L of the supernatant was combined with 181  $\mu$ L of buffer (50 mM TRIS-HCl with 5 mM EDTA, pH 8.1), 20  $\mu$ L of freshly made DTNB (1 mM), 2  $\mu$ L of acetyl-coenzyme A (15 mM), and 2  $\mu$ L of freshly made oxaloacetate acid (10 mM) to initiate the reaction. The results were obtained in 2 min by measuring the absorbance change at 412 nm using a multimode microplate reader (Varioskan Flash-Spectral Scanning Multimode Microplate Reader 183, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) at 37 °C. The CS activity was measured in duplicate and expressed as  $\mu$ mol/min/mg of protein.

##### 4.6.2. Cytochrome c Oxidase Activity

Cytochrome c oxidase (COX) activity was measured according to [75] using a microplate combining 5  $\mu$ L of supernatant, 192  $\mu$ L of K phosphate buffer (50 mM, 1 mM EDTA, pH 7.2), and 3  $\mu$ L of 2 mM reduced cytochrome c (c2037; Sigma-Aldrich; USA; reduced with ascorbic acid 20:1) to initiate the reaction. The COX activity was measured in duplicate at 37 °C, with an absorbance of 550 nm using a microplate reader (Varioskan Flash-Spectral Scanning Multimode Microplate Reader 183, Thermo Scientific, MA, USA). The results were expressed as nmol/min/mg of protein. Protein concentration was measured with the Bradford method.

#### 4.7. Statistical Analysis

All results were analyzed using the GraphPad Prism 8.3 software program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A one-way ANOVA with least significant difference (LSD) post hoc test was used to analyze body and hippocampus weight, 25(OH)D<sub>3</sub> concentration, and the results obtained from the Western Blot with chemiluminescence using Image Lab 6.1.0 software. A one-way ANOVA with a Tukey post hoc test was used for CS and COX enzyme activity. *p*-values < 0.05 were considered significant. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

**Author Contributions:** Conceptualization, D.K.-L., M.J.K. and J.J.K.; data curation, D.K.-L. and J.J.K.; formal analysis, D.K.-L., M.J.K. and J.J.K.; funding acquisition, M.J.K. and J.J.K.; investigation, D.K.-L., M.J.K., D.M. and J.J.K.; methodology, D.K.-L., D.M. and J.J.K.; project administration, M.J.K. and J.J.K.; supervision J.J.K.; writing—original draft, D.K.-L. and J.J.K.; writing—review and editing, D.K.-L., M.J.K., D.M. and J.J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by grants from the National Science Centre in Poland (grant number: 2018/31/N/NZ7/03680) and the Faculty of Biology, University of Gdansk, Poland (DS No. 531-D080-D248-23).

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Local Ethics Committee in Bydgoszcz, Poland (No. 10/2019).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The datasets used and/or analyzed in the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declared no conflict of interest regarding the publication of this article. The funders had no role in the design of this study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of this manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Giles, A.J.; Hutchinson, M.N.D.; Sonnemann, H.M.; Jung, J.; Fecci, P.E.; Ratnam, N.M.; Zhang, W.; Song, H.; Bailey, R.; Davis, D.; et al. Dexamethasone-Induced Immunosuppression: Mechanisms and Implications for Immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **2018**, *6*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Tokuda, E.; Watanabe, S.; Okawa, E.; Ono, S. Regulation of Intracellular Copper by Induction of Endogenous Metallothioneins Improves the Disease Course in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* **2015**, *12*, 461–476. [[CrossRef](#)]
3. Johnson, D.B.; Lopez, M.J.; Kelley, B. Dexamethasone. In *Statpearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2022.
4. Wiersinga, W.J.; Rhodes, A.; Cheng, A.C.; Peacock, S.J.; Prescott, H.C. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA* **2020**, *324*, 782–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Manoli, I.; Alesci, S.; Blackman, M.R.; Su, Y.A.; Rennert, O.M.; Chrousos, G.P. Mitochondria as Key Components of the Stress Response. *Trends Endocrinol. Metab.* **2007**, *18*, 190–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chung, S.; Son, G.H.; Kim, K. Circadian Rhythm of Adrenal Glucocorticoid: Its Regulation and Clinical Implications. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1812*, 581–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Herman, J.P.; McKlveen, J.M.; Ghosal, S.; Kopp, B.; Wulsin, A.; Makinson, R.; Scheimann, J.; Myers, B. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr. Physiol.* **2016**, *6*, 603–621.
8. Karnia, M.J.; Korewo, D.; Myslinska, D.; Ciepiewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* **2021**, *13*, 936. [[CrossRef](#)]
9. Karnia, M.J.; Myslinska, D.; Dzik, K.P.; Flis, D.J.; Ciepiewski, Z.M.; Podlacha, M.; Kaczor, J.J. The Electrical Stimulation of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Causes Oxidative Stress in Skeletal Muscle of Rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 4671213. [[CrossRef](#)]
10. Du, J.; Wang, Y.; Hunter, R.; Wei, Y.; Blumenthal, R.; Falke, C.; Khairova, R.; Zhou, R.; Yuan, P.; Machado-Vieira, R.; et al. Dynamic Regulation of Mitochondrial Function by Glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3543–3548. [[CrossRef](#)]
11. Ouanes, S.; Popp, J. High Cortisol and the Risk of Dementia and Alzheimer’s Disease: A Review of the Literature. *Front. Aging Neurosci.* **2019**, *11*, 43. [[CrossRef](#)]
12. van Wamelen, D.J.; Leta, V.; Johnson, J.; Ocampo, C.L.; Podlewska, A.M.; Rukavina, K.; Rizos, A.; Martinez-Martin, P.; Chaudhuri, K.R. Drooling in Parkinson’s Disease: Prevalence and Progression from the Non-Motor International Longitudinal Study. *Dysphagia* **2020**, *35*, 955–961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Monzio Compagnoni, G.; Di Fonzo, A.; Corti, S.; Comi, G.P.; Bresolin, N.; Masliah, E. The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: The Lesson from Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57*, 2959–2980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Xu, J.; Wang, R.; Liu, Y.; Wang, W.; Liu, D.; Jiang, H.; Pan, F. Short- and Long-Term Alterations of Fkbp5-Gr and Specific Micromas in the Prefrontal Cortex and Hippocampus of Male Rats Induced by Adolescent Stress Contribute to Depression Susceptibility. *Psychoneuroendocrinology* **2019**, *101*, 204–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ciriaco, M.; Ventrice, P.; Russo, G.; Scicchitano, M.; Mazzitello, G.; Scicchitano, F.; Russo, E. Corticosteroid-Related Central Nervous System Side Effects. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2013**, *4* (Suppl. 1), S94–S98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Edelman, M.N.; Ogg, R.J.; Scoggins, M.A.; Brinkman, T.M.; Sabin, N.D.; Pui, C.H.; Srivastava, D.K.; Robison, L.L.; Hudson, M.M.; Krull, K.R. Dexamethasone Exposure and Memory Function in Adult Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report from the Sllife Cohort. *Pediatr. Blood Cancer* **2013**, *60*, 1778–1784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sapolsky, R.M. Stress and the Brain: Individual Variability and the Inverted-U. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18*, 1344–1346. [[CrossRef](#)]
18. Sapolsky, R.M. Glucocorticoids and Hippocampal Atrophy in Neuropsychiatric Disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* **2000**, *57*, 925–935. [[CrossRef](#)]
19. Starkman, M.N.; Gebarski, S.S.; Berent, S.; Schteingart, D.E. Hippocampal Formation Volume, Memory Dysfunction, and Cortisol Levels in Patients with Cushing’s Syndrome. *Biol. Psychiatry* **1992**, *32*, 756–765. [[CrossRef](#)]
20. Levone, B.R.; Codagnone, M.G.; Moloney, G.M.; Nolan, Y.M.; Cryan, J.F.; OF, L. Adult-Born Neurons from the Dorsal, Intermediate, and Ventral Regions of the Longitudinal Axis of the Hippocampus Exhibit Differential Sensitivity to Glucocorticoids. *Mol. Psychiatry* **2021**, *26*, 3240–3252. [[CrossRef](#)]
21. Silva-Gómez, A.B.; Aguilar-Salgado, Y.; Reyes-Hernández, D.O.; Flores, G. Dexamethasone Induces Different Morphological Changes in the Dorsal and Ventral Hippocampus of Rats. *J. Chem. Neuroanat.* **2013**, *47*, 71–78. [[CrossRef](#)]
22. MacPherson, A.; Dinkel, K.; Sapolsky, R. Glucocorticoids Worsen Excitotoxin-Induced Expression of Pro-Inflammatory Cytokines in Hippocampal Cultures. *Exp. Neurol.* **2005**, *194*, 376–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tsankova, N.; Renthal, W.; Kumar, A.; Nestler, E.J. Author Correction: Epigenetic Regulation in Psychiatric Disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **2019**, *20*, 187–188. [[CrossRef](#)]
24. Numata, S.; Ishii, K.; Tajima, A.; Iga, J.; Kinoshita, M.; Watanabe, S.; Umehara, H.; Fuchikami, M.; Okada, S.; Boku, S.; et al. Blood Diagnostic Biomarkers for Major Depressive Disorder Using Multiplex DNA Methylation Profiles: Discovery and Validation. *Epigenetics* **2015**, *10*, 135–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Berton, O.; McClung, C.A.; Dileone, R.J.; Krishnan, V.; Renthal, W.; Russo, S.J.; Graham, D.; Tsankova, N.M.; Bolanos, C.A.; Rios, M.; et al. Essential Role of Bdnf in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. *Science* **2006**, *311*, 864–868. [[CrossRef](#)]
26. Taliáz, D.; Loya, A.; Gersner, R.; Haramati, S.; Chen, A.; Zangen, A. Resilience to Chronic Stress Is Mediated by Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 4475–4483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Wrigley, S.; Arafa, D.; Tropea, D. Insulin-Like Growth Factor 1: At the Crossroads of Brain Development and Aging. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, 14. [[CrossRef](#)]
28. Baldini, S.; Restani, L.; Baroncelli, L.; Coltelli, M.; Franco, R.; Cenni, M.C.; Maffei, L.; Berardi, N. Enriched Early Life Experiences Reduce Adult Anxiety-Like Behavior in Rats: A Role for Insulin-Like Growth Factor 1. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 11715–11723. [[CrossRef](#)]
29. Santi, A.; Bot, M.; Aleman, A.; Penninx, B.; Aleman, I.T. Circulating Insulin-Like Growth Factor I Modulates Mood and Is a Biomarker of Vulnerability to Stress: From Mouse to Man. *Transl. Psychiatry* **2018**, *8*, 142. [[CrossRef](#)]
30. Barrientos, R.M.; Thompson, V.M.; Kitt, M.M.; Amat, J.; Hale, M.W.; Frank, M.G.; Crysdale, N.Y.; Stamper, C.E.; Hennessey, P.A.; Watkins, L.R.; et al. Greater Glucocorticoid Receptor Activation in Hippocampus of Aged Rats Sensitizes Microglia. *Neurobiol. Aging* **2015**, *36*, 1483–1495. [[CrossRef](#)]
31. Herman, J.P.; Patel, P.D.; Akil, H.; Watson, S.J. Localization and Regulation of Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptor Messenger Rnas in the Hippocampal Formation of the Rat. *Mol. Endocrinol.* **1989**, *3*, 1886–1894. [[CrossRef](#)]
32. Zhe, D.; Fang, H.; Yuxiu, S. Expressions of Hippocampal Mineralocorticoid Receptor (Mr) and Glucocorticoid Receptor (Gr) in the Single-Prolonged Stress-Rats. *Acta Histochem. Cytochem.* **2008**, *41*, 89–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sapolsky, R.M.; Krey, L.C.; McEwen, B.S. Stress Down-Regulates Corticosterone Receptors in a Site-Specific Manner in the Brain. *Endocrinology* **1984**, *114*, 287–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kokkinopoulou, I.; Moutsatsou, P. Mitochondrial Glucocorticoid Receptors and Their Actions. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Charoengam, N.; Holick, M.F. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients* **2020**, *12*, 2097. [[CrossRef](#)]
36. An, B.S.; Tavera-Mendoza, L.E.; Dimitrov, V.; Wang, X.; Calderon, M.R.; Wang, H.J.; White, J.H. Stimulation of Sirt1-Regulated Foxo Protein Function by the Ligand-Bound Vitamin D Receptor. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 4890–4900. [[CrossRef](#)]
37. Ricca, C.; Aillon, A.; Bergandi, L.; Alotto, D.; Castagnoli, C.; Silvagno, F. Vitamin D Receptor Is Necessary for Mitochondrial Function and Cell Health. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1672. [[CrossRef](#)]
38. Son, G.; Han, J. Roles of Mitochondria in Neuronal Development. *BMB Rep.* **2018**, *51*, 549–556. [[CrossRef](#)]
39. Jiang, P.; Zhang, W.Y.; Li, H.D.; Cai, H.L.; Liu, Y.P.; Chen, L.Y. Stress and Vitamin D: Altered Vitamin D Metabolism in Both the Hippocampus and Myocardium of Chronic Unpredictable Mild Stress Exposed Rats. *Psychoneuroendocrinology* **2013**, *38*, 2091–2098. [[CrossRef](#)]
40. Camargo, A.; Dalmagro, A.P.; Platt, N.; Rosado, A.F.; Neis, V.B.; Zeni, A.L.B.; Kaster, M.P.; Rodrigues, A.L.S. Cholecalciferol Abolishes Depressive-Like Behavior and Hippocampal Glucocorticoid Receptor Impairment Induced by Chronic Corticosterone Administration in Mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2020**, *196*, 172971. [[CrossRef](#)]
41. Al-Amin, M.; Bradford, D.; Sullivan, R.K.P.; Kurniawan, N.D.; Moon, Y.; Han, S.H.; Zalesky, A.; Burne, T.H.J. Vitamin D Deficiency Is Associated with Reduced Hippocampal Volume and Disrupted Structural Connectivity in Patients with Mild Cognitive Impairment. *Hum. Brain Mapp.* **2019**, *40*, 394–406. [[CrossRef](#)]
42. Bakhtiari-Dovvombaygi, H.; Izadi, S.; Zare, M.; Hassanlouei, E.A.; Dinpanah, H.; Ahmadi-Soleimani, S.M.; Beheshti, F. Vitamin D3 Administration Prevents Memory Deficit and Alteration of Biochemical Parameters Induced by Unpredictable Chronic Mild Stress in Rats. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 16271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dzik, K.P.; Skrobot, W.; Kaczor, K.B.; Flis, D.J.; Karnia, M.J.; Libionka, W.; Antosiewicz, J.; Kloc, W.; Kaczor, J.J. Vitamin D Deficiency Is Associated with Muscle Atrophy and Reduced Mitochondrial Function in Patients with Chronic Low Back Pain. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 6835341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dzik, K.P.; Kaczor, J.J. Mechanisms of Vitamin D on Skeletal Muscle Function: Oxidative Stress, Energy Metabolism and Anabolic State. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2019**, *119*, 825–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Consiglio, M.; Viano, M.; Casarin, S.; Castagnoli, C.; Pescarmona, G.; Silvagno, F. Mitochondrial and Lipogenic Effects of Vitamin D on Differentiating and Proliferating Human Keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2015**, *24*, 748–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Otsuka, Y.; Egawa, K.; Kanzaki, N.; Izumo, T.; Rogi, T.; Shibata, H. Quercetin Glycosides Prevent Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy in Mice. *Biochem. Biophys. Rep.* **2019**, *18*, 100618. [[CrossRef](#)]
47. Aru, M.; Alev, K.; Pehme, A.; Purge, P.; Onnik, L.; Ellam, A.; Kaasik, P.; Seene, T. Changes in Body Composition of Old Rats at Different Time Points after Dexamethasone Administration. *Curr. Aging Sci.* **2019**, *11*, 255–260. [[CrossRef](#)]
48. Alev, K.; Aru, M.; Vain, A.; Pehme, A.; Kaasik, P.; Seene, T. Short-Time Recovery Skeletal Muscle from Dexamethasone-Induced Atrophy and Weakness in Old Female Rats. *Clin. Biomech.* **2022**, *100*, 105808. [[CrossRef](#)]
49. Koorneef, L.L.; van der Meulen, M.; Kooijman, S.; Sanchez-Lopez, E.; Scheerstra, J.F.; Voorhoeve, M.C.; Ramesh, A.N.N.; Rensen, P.C.N.; Giera, M.; Kroon, J.; et al. Dexamethasone-Associated Metabolic Effects in Male Mice Are Partially Caused by Depletion of Endogenous Corticosterone. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 960279. [[CrossRef](#)]
50. Guarnotta, V.; Di Gaudio, F.; Giordano, C. Vitamin D Deficiency in Cushing’s Disease: Before and after Its Supplementation. *Nutrients* **2022**, *14*, 973. [[CrossRef](#)]
51. Xu, J.; Zhang, X.; Feng, S.; Zhao, N.; Hu, X.; Cheng, Y.; Wu, Y.; Zhou, L.; Tong, J.; Zheng, C. Clinical Efficacy of High-Dose Dexamethasone with Sequential Prednisone Maintenance Therapy for Newly Diagnosed Adult Immune Thrombocytopenia in a Real-World Setting. *J. Int. Med. Res.* **2021**, *49*, 3000605211007322. [[CrossRef](#)]

52. Eshkevari, L.; Mulrone, S.E.; Egan, R.; Lao, L. Effects of Acupuncture, Ru-486 on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Chronically Stressed Adult Male Rats. *Endocrinology* **2015**, *156*, 3649–3660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Unemura, K.; Kume, T.; Kondo, M.; Maeda, Y.; Izumi, Y.; Akaike, A. Glucocorticoids Decrease Astrocyte Numbers by Reducing Glucocorticoid Receptor Expression in Vitro and in Vivo. *J. Pharmacol. Sci.* **2012**, *119*, 30–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zhang, B.; Zhang, Y.; Xu, T.; Yin, Y.; Huang, R.; Wang, Y.; Zhang, J.; Huang, D.; Li, W. Chronic Dexamethasone Treatment Results in Hippocampal Neurons Injury Due to Activate Nlrp1 Inflammasome in Vitro. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *49*, 222–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Skupio, U.; Tertilt, M.; Sikora, M.; Golda, S.; Wawrzczak-Bargiela, A.; Przewlocki, R. Behavioral and Molecular Alterations in Mice Resulting from Chronic Treatment with Dexamethasone: Relevance to Depression. *Neuroscience* **2015**, *286*, 141–150. [[CrossRef](#)]
56. Froger, N.; Palazzo, E.; Boni, C.; Hanoun, N.; Saurini, F.; Joubert, C.; Dutriez-Casteloot, I.; Enache, M.; Maccari, S.; Barden, N.; et al. Neurochemical and Behavioral Alterations in Glucocorticoid Receptor-Impaired Transgenic Mice after Chronic Mild Stress. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 2787–2796. [[CrossRef](#)]
57. Kunugi, H.; Hori, H.; Adachi, N.; Numakawa, T. Interface between Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Depression. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **2010**, *64*, 447–459. [[CrossRef](#)]
58. Yau, J.L.; Seckl, J.R. Local Amplification of Glucocorticoids in the Aging Brain and Impaired Spatial Memory. *Front/Aging Neurosci.* **2012**, *4*, 24. [[CrossRef](#)]
59. Koning, A.; Habets, P.C.; Bogaards, M.; Kroon, J.; van Santen, H.M.; de Bont, J.M.; Meijer, O.C. Mineralocorticoid Receptor Status in the Human Brain after Dexamethasone Treatment: A Single Case Study. *Endocr. Connect.* **2022**, *11*, e210425. [[CrossRef](#)]
60. Hidalgo, A.A.; Deeb, K.K.; Pike, J.W.; Johnson, C.S.; Trump, D.L. Dexamethasone Enhances 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 Effects by Increasing Vitamin D Receptor Transcription. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 36228–36237. [[CrossRef](#)]
61. Zenata, O.; Vrzal, R. Fine Tuning of Vitamin D Receptor (Vdr) Activity by Post-Transcriptional and Post-Translational Modifications. *Oncotarget* **2011**, *8*, 35390–35402. [[CrossRef](#)]
62. Consiglio, M.; Destefanis, M.; Morena, D.; Foglizzo, V.; Forneris, M.; Pescarmona, G.; Silvagno, F. The Vitamin D Receptor Inhibits the Respiratory Chain, Contributing to the Metabolic Switch That Is Essential for Cancer Cell Proliferation. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e115816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Srinivasan, S.; Avadhani, N.G. Cytochrome C Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 1252–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Desquiere, V.; Gueguen, N.; Malthiery, Y.; Ritz, P.; Simard, G. Mitochondrial Effects of Dexamethasone Imply Both Membrane and Cytosolic-Initiated Pathways in Hepg2 Cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 1629–1641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Scaini, G.; Rochi, N.; Benedet, J.; Ferreira, G.K.; Teodorak, B.P.; Comim, C.M.; Lde, S.C.; Vuolo, F.; Constantino, L.C.; Quevedo, J.; et al. Inhibition of Brain Citrate Synthase Activity in an Animal Model of Sepsis. *Rev. Bras. De Ter. Intensiv.* **2011**, *23*, 158–163. [[CrossRef](#)]
66. Meng, L.B.; Hu, G.F.; Shan, M.J.; Zhang, Y.M.; Yu, Z.M.; Liu, Y.Q.; Xu, H.X.; Wang, L.; Gong, T.; Liu, D.P. Citrate Synthase and Ogdh as Potential Biomarkers of Atherosclerosis under Chronic Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 9957908. [[CrossRef](#)]
67. Hajiluan, G.; Farhangi, M.A.; Nameni, G.; Shahabi, P.; Megari-Abbasi, M. Oxidative Stress-Induced Cognitive Impairment in Obesity Can Be Reversed by Vitamin D Administration in Rats. *Nutr. Neurosci.* **2018**, *21*, 744–752. [[CrossRef](#)]
68. AlJohri, R.; AlOkail, M.; Haq, S.H. Neuroprotective Role of Vitamin D in Primary Neuronal Cortical Culture. *eNeurologicalSci* **2019**, *14*, 43–48. [[CrossRef](#)]
69. Obradovic, D.; Gronemeyer, H.; Lutz, B.; Rein, T. Cross-Talk of Vitamin D and Glucocorticoids in Hippocampal Cells. *J. Neurochem.* **2006**, *96*, 500–509. [[CrossRef](#)]
70. Hagl, S.; Asseburg, H.; Heinrich, M.; Sus, N.; Blumrich, E.M.; Dringen, R.; Frank, J.; Eckert, G.P. Effects of Long-Term Rice Bran Extract Supplementation on Survival, Cognition and Brain Mitochondrial Function in Aged Nmr1 Mice. *Neuromolecular. Med.* **2016**, *18*, 347–363. [[CrossRef](#)]
71. Yousefian, Z.; Khaleghian, A.; Parsaei, H.; Vafaei, A.A.; Rashidy-Pour, A.; Sedaghat, K. Effect of Vitamin D on Hippocampus Brain-Derived Neurotrophic Factor Level in Chronic Mild Stress Model of Depression in Rats. *Middle East J. Rehabil. Health* **2018**, *5*, e63901. [[CrossRef](#)]
72. Xu, Y.; Liang, L. Vitamin D3/Vitamin D Receptor Signaling Mitigates Symptoms of Post-Stroke Depression in Mice by Upregulating Hippocampal Bdnf Expression. *Neurosci. Res.* **2021**, *170*, 306–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Chen, H.; Amazit, L.; Lombes, M.; Le Menuet, D. Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Early-Growth Response Protein 1 Accounts for Repression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcript 4 Expression. *Neuroscience* **2019**, *399*, 12–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Rola, R.; Kowalski, K.; Bieńkowski, T.; Studzińska, S. Improved Sample Preparation Method for Fast Lc-MS/MS Analysis of Vitamin D Metabolites in Serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *190*, 113529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Gianni, P.; Jan, K.J.; Douglas, M.J.; Stuart, P.M.; Tarnopolsky, M.A. Oxidative Stress and the Mitochondrial Theory of Aging in Human Skeletal Muscle. *Exp. Gerontol.* **2004**, *39*, 1391–1400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 7. Materiały i metody

### 7.1. Informacje dotyczące zwierząt

Do realizacji eksperymentu zawartego w niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano 26 samców szczurów stada niekrewniaczego Wistar pozyskanych z Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej – Centrum Badawczo – Usługowego, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (nr rejestracyjny 041). Zwierzętarńia spełnia wymogi ustawy o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych z dn. 15 stycznia 2015 r. (Dz. U. z dn. 26 lutego 2015 r.), a także zaleceń Komisji Europejskiej dotyczących dobrostanu zwierząt wykorzystywanych w doświadczeniach naukowych.

Zwierzęta zostały umieszczane po 3 osobniki w klatkach w wentylowanej zwierzętarńi (15 wymian powietrza na godzinę) oraz pokojach laboratoryjnych – w trakcie trwania doświadczeń. W warunkach sztucznego oświetlenia (12 godz. światło/12 godz. ciemność), stałej temperaturze otoczenia (22°C), stałej wilgotności powietrza (około 50%) z dostępem do pokarmu i czystej wody *ad libitum*. Szczury były karmione standardową pełnowartościową paszą dla zwierząt laboratoryjnych i utrzymywane w atestowanych klatkach laboratoryjnych o wysokości 18 cm i wielkości, co najmniej 800 cm<sup>2</sup>. Powierzchnia podłogi przypadającej na jedno zwierzę wynosiła, co najmniej 350 cm<sup>2</sup> (przy uwzględnieniu możliwego przyrostu masy ciała). Celem zapewnienia zwierzętom odpowiednich warunków do wypoczynku oraz snu, klatki hodowlane wyłożone zostały materiałem ściółkowym. W celu zapewnienia optymalnego wzbogacenia środowiska zastosowane zostały odpowiednie atraktanty i akcesoria dla gryzoni (klocki, tunele itd.). Dodatkowo dokonana została okresowa ocena stanu zdrowia zwierząt przez wykwalifikowany personel laboratoryjny.

## **7.2. Projekt eksperymentu**

### **7.2.1. Ekspozycja na działanie egzogennych GK**

Opis projektu został szczegółowo przedstawiony w artykułach Karnia i wsp., 2021 oraz Korewo-Labelle i wsp. (2023) o tytułach:

„The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy” (podrozdział 6.1. rozprawy doktorskiej) oraz „Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats” (podrozdział 6.2. rozprawy doktorskiej).

### **7.2.2. Ekspozycja na działanie endogennych GK**

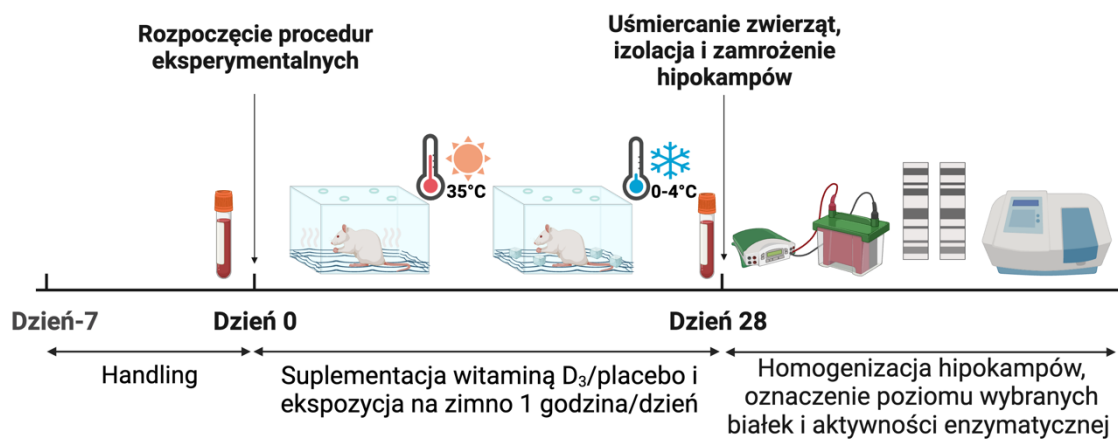
Częściowo metodologia projektu została opisana w artykule Karnia i wsp. (2021): „The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy” (podrozdział 6.1. dysertacji doktorskiej).

7 dni przed przystąpieniem do badań zwierzęta były przyzwyczajane do eksperymentatora podczas osvajania (handlingu). Handling miał na celu ograniczenie stresu zwierząt w momencie kontaktu z badaczem. Szczury były przyzwyczajane do zapachu i dotyku w czasie codziennych wizyt związanych z wymianą ściółki, czy karmieniem, a także przyzwyczajane do procedur takich jak pobranie krwi, czy suplementacja.

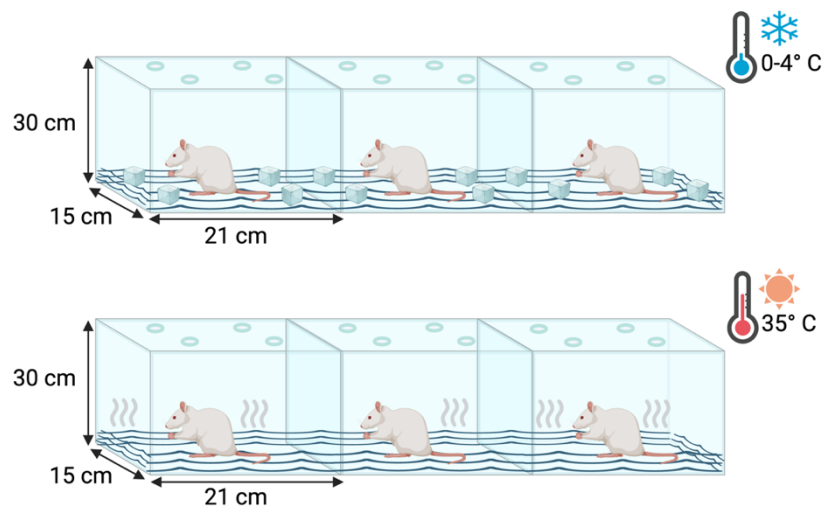
Zwierzęta w wieku 3 miesięcy i masie ciała 300-400 g losowo podzielono na 4 grupy: (1) kontrolną (KON, n = 4), (2) pozorowanego stresu poprzez zanurzenie w ciepłej wodzie (CW, n = 6), (3) zanurzoną w zimnej wodzie otrzymującą dopyszczkowo placebo w postaci oleju roślinnego (ZW, n = 8) oraz (4) zanurzoną w zimnej wodzie suplementowaną witaminą D<sub>3</sub> (600 IU/kg Juvit D<sub>3</sub>; ZWD, n = 8). Przez 28 dni eksperymentu zwierzęta były umieszczane pojedynczo w szklanym zbiorniku o wymiarach 21 x 15 x 30 cm wypełnionym wodą do głębokości 1 cm, gdzie spędzały 60 minut/dzień. W grupie ZW i ZWD temperatura wody z lodem wynosiła 0-4°C, natomiast w grupie CW: 34-36°C. Każdego dnia eksperymentu zwierzęta z grupy ZWD otrzymywały do pyszczkowo – przy pomocy zgłębnika 1-1,5 kropli witaminy D<sub>3</sub>.

Badania zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Badań na Zwierzętach mieszczącą się w Bydgoszczy (nr 10/2019) i przeprowadzone zgodnie z europejskimi wytycznymi.

Po 28 dniach eksperymentu, zwierzęta zostały znieczulone za pomocą wziewnej narkozy izofluranowej (2,5 %, przepływ 0,5 l/ min). Następnie zwierzęta poddano eutanazji z użyciem metod fizycznych (dekapitacja), aby zapobiec ewentualnym interakcjom środków znieczulających wpływających na funkcję i bioenergetykę mitochondriów.



Rycina 6. Schemat eksperymentu w czasie.



Rycina 7. Schemat ekspozycji zwierząt na zimno/ciepło w szklanych zbiornikach.



### **7.3. Pobieranie tkanek**

Pierwszego i ostatniego dnia eksperymentu pobrano 1 ml krwi obwodowej szczurów z żyły ogonowej strzykawką (średnica igły 0,7  $\mu\text{m}$ ). Zwierzęta przed wykonaniem procedury wprowadzono w stan narkozy izofluranowej (2,5 %) o stałym przepływie wynoszącym 0,5 l/ min. Następnie krew przeniesiono do probówek z dodatkiem antykoagulantu – kwasu wersenowego (EDTA) i wirowano przez 10 minut przy szybkości  $2000 \times g$  w temperaturze 4°C. Otrzymane osocze rozdzielono do mikroprobówek i zamrożono w -80°C do momentu wykonania oznaczeń stężenia 25(OH)D<sub>3</sub> i jej metabolitów.

Hipokampy szczurów, podobnie jak inne tkanki i organy zostały wyizolowane pośmiertnie, zważone i zamrożone poprzez umieszczenie w ciekłym azocie (Karnia i wsp., 2021). Następnie materiał biologiczny przechowywano w mikroprobówkach w -80°C do dalszych analiz biochemicznych.

### **7.4. Oznaczanie poziomu metabolitów witaminy D<sub>3</sub>**

Zgodnie z metodologią zawartą w artykule Karnia i wsp. (2021) (podrozdział 7.1. dysertacji doktorskiej) stężenie 25(OH)D<sub>3</sub> i metabolity witaminy D w osoczu zwierząt oznaczono za pomocą chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Materiał biologiczny został przeanalizowany przy użyciu systemu analitycznego HPLC Eksigent ExionLC z autosamplerem CTC PAL (Zwinger, Szwajcaria) połączonego z systemem QTRAP® 4500 MS/MS (Sciex, Framingham, USA).

### **7.5. Kinetyka reakcji enzymatycznych**

#### **7.5.1. Przygotowanie tkanki do badań**

Homogenizację hipokampów wykonano w buforze do lizy zawierającym 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5 mM ditiotreitól (DTT; 443853B, VWR International, USA), 1 mM butylowany hydroksytoluen (BHT; B-1378, Sigma, USA) oraz inhibitory proteaz (1:1000; P834, Sigma, USA). 4 % homogenat został następnie odwirowany przy  $750 \times g$  przez 10 minut w temperaturze 4°C. Następnie podzielono supernatant do mikroprobówek i zamrożono w -80°C.

Każdorazowo przed wykonaniem następujących analiz wykonano oznaczenia poziomu białka w próbach z wykorzystaniem zestawu „Pierce BCA Protein Assay Kit” (23225, Thermo Scientific, USA). Supernatant rozcieńczono z dejonizowaną wodą, wolną od drobnoustrojów w proporcji 1:10. Zawartość całkowitego białka oznaczono zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu.

### **7.5.2. Oznaczanie aktywności syntazy cytrynianowej (CS)**

Aktywność CS została wykonana zgodnie z procedurą przedstawioną w artykule Korewo-Labelle i wsp. (2023). W skrócie, do każdego dołka płytki 96-dołkowej odpipetowano 181  $\mu$ l buforu (50 mM TRIS-HCL, 5 mM EDTA; pH 8,1) i dodano 3  $\mu$ l 750 x g supernatantu. Następnie dodano 20  $\mu$ l świeżo przygotowanego 1 mM DTNB, 2  $\mu$ l 15 mM acetylo-koenzym A oraz 2  $\mu$ l 10 mM kwasu szczawiooctowego. Pomiar aktywności CS wykonano w 2 powtórzeniach przez 2 minuty i zmierzono przy zastosowaniu czytnika mikroplatek (Varioskan Flash-Spectral Scanning Multimode Microplate Reader, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) przy absorbancji 412 nm i temperaturze 37°C. Wyniki pomiaru wyrażano w  $\mu$ mol/min/mg białka.

### **7.5.3. Oznaczenie aktywności oksydazy cytochromu c (COX)**

Zgodnie z metodyką opisaną w artykule Korewo-Labelle i wsp. (2023), określono aktywność oksydazy cytochromu c (COX). W skrócie, do 192  $\mu$ l 50 mM buforu fosforanowego (1 mM EDTA, pH 7,2) dodano supernatant tkankowy oraz 3  $\mu$ l 2 mM cytochrom c (c2037; Sigma-Aldrich; USA) zredukowany kwasem askorbinowym (20:1). Pomiar został wykonany w 2 powtórzeniach przez 2 minuty. Wyniki aktywności COX uzyskano przy pomiarach absorbancji 550 nm i temperaturze 37°C z zastosowaniem czytnika mikroplatek (Varioskan Flash-Spectral Scanning Multimode Microplate Reader 183, Thermo Scientific, MA, USA). Uzyskane wyniki wyrażono w nmol/min/mg białka.

### **7.5.4. Oznaczanie zawartości grup sulfhydrylowych (-SH)**

Oznaczenia zawartości wolnych grup -SH, jednego z markerów wolnorodnikowych uszkodzeń białek, zostały wykonane następująco: do 20  $\mu$ l 4% supernatantu hipokampa dodano 200  $\mu$ l 10 mM buforu sodowo-fosforanowego (pH 8,0). W celu odsłonięcia grup -SH białek dodano 30  $\mu$ l 10 % dodecylosiarczanu sodu (SDS; 33629.266, VWR

International) oraz 30  $\mu$ l 0,1 mM kwasu 2,2-ditiobisnitrobenzoesowego (DTNB; VWR International, USA). Całość inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Następnie dokonano pomiaru absorbancji z wykorzystaniem czytnika mikroplitek (Varioskan Flash-Spectral Scanning Multimode Microplate Reader 183, Thermo Scientific, MA, USA). przy długości fali 405 nm w 37°C. Wartości dla grup -SH zostały obliczone względem próby ślepej (bez DTNB) z krzywej wzorcowej – zredukowanego glutationu (GSH; GA251-10G, Sigma, USA). Zawartość grup -SH wyrażono w mM/ g tkanki.

#### **7.5.5. Oznaczanie stężenia dialdehydu malonowego (MDA)**

Wolnorodnikowe uszkodzenia lipidów w hipokampie oznaczono wykonując pomiary poziomu dialdehydu malonowego (MDA). Lizaty (zawierające 0,05% butylohydroksytoluen (BHT) odwirowano przy 4000  $\times$  g przez 10 minut, w temperaturze 4°C. Do wykonania rozcieńczeń wykorzystano 0,02 M Tris-HCl (pH 7,2). Następnie do 325  $\mu$ l roztworu reakcyjnego R1 (Tabela 3.) dodano 50  $\mu$ l próby badanej, 50  $\mu$ l wody destylowanej, wolnej od drobnoustrojów oraz 75  $\mu$ l 37% HCl. Absorbancję zmierzono przy długości fali 586 nm z wykorzystaniem tego samego czytnika. Stężenie MDA w próbkach oznaczono używając 10 mM 1,1,3,3-tetrametoksypropanu jako standardu – do wyznaczenia krzywej wzorcowej w zakresie stężeń 0-5 nmol. Stężenie MDA wyrażono w nmol/g tkanki.

#### **7.5.6. Oznaczanie poziomu 8-izoprostanów**

Do oceny uszkodzeń lipidów wywołanych przez wolne rodniki zastosowano test immunoenzymatyczny ELISA analizujący zawartość 8-izoprostanów (516351; Cayman Chemical; MI, USA) w lizacie hipokampa. Materiał do analizy został przygotowany i przeanalizowany zgodnie z zaleceniami producenta – zawierał 0,05 % roztwór BHT, w celu zapobiegania dalszemu utlenianiu lipidów. Absorbancję próbek mierzono za pomocą czytnika mikroplitek Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter; USA) przy długości fali 405 nm i temperaturze 37°C. Wyniki pomiaru wyrażano w pg/ml próbki.

Tabela 3. Bufory i odczynniki wykorzystane do oznaczeń kinetycznych.

| Nazwa                            | Producent (numer katalogowy)       | Skład  | Zastosowanie  |
|----------------------------------|------------------------------------|--|---|
| Bufor Tris-HCl                   | --                                 | 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, pH 7,4 | Bufor do homogenizacji materiału biologicznego                            |
| Protease Inhibitor Cocktail      | Sigma, USA (P834)                  | --   | Protekcja białek podczas homogenizacji                                    |
| Zredukowany glutation (GSH)      | Sigma, USA (GA251-10G)             | --   | Standard do wyznaczenia krzywej wzorcowej grup -SH                        |
| Dodecylosiarczan sodu            | VWR International, USA (33629.266) | --   | Odsłonięcie białkowych grup -SH   |
| Kwas 2,2-ditiobisnitrobenzoesowy | VWR International, USA             | --   | Ilościowa reakcja z wolnymi grupami -SH. Daje wykrywalny produkt TNB      |
| 1,1,3,3-tetrametoksypropan       | Sigma, USA (T-9889)                | 1,1,3,3-tetrametoksypropan $\geq 96\%$                     | Standard do wyznaczenia krzywej wzorcowej MDA                             |
| Roztwór R1                       | --                                 | N-metylo-2fenylindol, acetonitryl, metanol                 | Reakcja z MDA daje stabilny chromofor o intensywnej absorpcji przy 586 nm |

## 7.6. Ilościowa analiza białek

### 7.6.1. Przygotowanie tkanki do analizy

W celu detekcji i analizy poziomu wybranych białek zastosowano metodę Western Blot. Hipokampy zostały homogenizowane w buforze RIPA (Pierce RIPA Buffer, 89901, Thermo Scientific, USA) z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz (Halt™ Protease i Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X), 1861280, Thermo Scientific, USA) w stosunku 1:100. Następnie 8 % homogenat został odwirowany przy  $750 \times g$  następnie zebrany z nad osadu homogenat wirowano przy  $12\ 000 \times g$  w temperaturze  $4^{\circ}C$ . Supernatant podzielono do probówek wirówkowych oraz przechowywano w  $-80^{\circ}C$  do momentu wykonania kolejnych czynności.

Każdorazowo przed wykonaniem kolejnych procedur poddawano ocenie poziom białka w lizatach hipokampów. Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem zestawu

„Pierce BCA Protein Assay Kit” (23225, Thermo Scientific, USA) i przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta.

### **7.6.2. Procedura Western Blot**

Western Blot, jako najpowszechniejsza ilościowa metoda identyfikacji białek, opierającą się na przeniesieniu rozdzielonych (po elektroforezie) białek z żelu na membranę podczas transferu (w tym przypadku półsuchego), a następnie wizualizacji wybranych białek przy zastosowaniu przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych. Sprzężona z przeciwciałami drugorzędowymi peroksydaza, w obecności nadtlenu wodoru utlenia luminol, czego efektem jest wydzielona energia w postaci światła. Reakcja ta pozwala na zobrazowanie i wyznaczenie poziomu białka znormalizowanego do jego całości.

Lizaty zawierające 25-30 µg białka poddawano frakcjonowaniu wielkościowemu w 10 % lub 12 % mini żelach PAGE (mini protean TGX Precast Protein Gels; 4561035, 4561045; BioRad, USA) w warunkach: 125 V, 0,05 A, 6 W przez około 50 minut. Następnie wykonano 7 minutowy elektrotransfer białek na membranę przy użyciu „Trans-Blot Turbo Transfer System” (BioRad, USA) przy 25 V. Membrany były blokowane przez 30 minut w buforze do blokowania „Every Blot Blocking Buffer” (12010020; BioRad, USA) lub 2 godziny w 5% mleku beztłuszczowym rozpuszczonym w TBST, następnie inkubowane przez noc w przeciwciałach pierwszorzędowych. Zastosowane zostały przeciwciała: GR (1:500; ab183127, Abcam, UK), MR (1:1000; ab64457, Abcam, UK), VDR (1:1000; ab3508, Abcam, UK), COX II (1:1000; NBP294364, Novusbio, USA;), COX IV (1:1000; 4D11B3E8, Cell Signaling, USA), PGC-1 $\alpha$  (1:1000 ab191838, Abcam, UK) BDNF (1:1000; ab108319, Abcam, UK), Akt (1:1000; C67E7, Cell Signaling, USA), pAkt (1: 1000; D25E6, Cell Signaling, USA), NFL (C28E10, Cell Signaling, USA), RBM3 (HPA003624, Sigma, USA) oraz  $\beta$ -tubulina (1:1000; AF7011, Affinity, USA). Po 5 krotnym płukaniu TBST (1x), membrany inkubowano przez 1 godzinę w przeciwciałach drugorzędowych sprzężonych z HRP: anty-mysich (ab6728; Abcam) i anty-króliczych (111-035-003; Jackson ImmunoResearch, UK) w rozcieńczeniu 1:1000-1:5000.

Wizualizacja uzyskanych wyników badań została dokonana za pomocą zestawu do wzmocnionej chemiluminescencji „Clarity Western ECL Substrate” (1705061; BioRad,

USA) i zobrazowane przy użyciu systemu „ChemiDoc MP” (BioRad, USA). Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania „Image Lab”. Dane zostały znormalizowane do całkowitej zawartości białka w próbce oraz  $\beta$ -tubuliny, a wartości wyrażono w stosunku do odpowiednich kontroli.

Tabela 4. Pierwszo- i drugorzędowe przeciwciała oraz warunki do oznaczenia poszczególnych białek zastosowane w pracy.

| Białko                           | Przeciwciała I rządowe |          |   |                | Przeciwciała II rządowe |          |                |
|----------------------------------|------------------------|----------|---|----------------|-------------------------|----------|----------------|
|                                  | Numer Katalogowy       | Stężenie | Mieszanina do blokowania/ rozcieńczeń     | Czas inkubacji | Numer katalogowy        | Stężenie | Czas inkubacji |
| GR (83kDa)                       | ab183127 (Rb)          | 1:500    | Every Blot Bloking Buffer                 | Przez całą noc | 111-035-003             | 1:1000   | 1 godz.        |
| MR (100kDa)                      | ab64457 (Rb)           | 1:1000   | Every Blot Bloking Buffer                 | Przez całą noc | 111-035-003             | 1:3000   | 1 godz.        |
| VDR (48kDa)                      | ab3508 (Rb)            | 1:1000   | Every Blot Bloking Buffer                 | Przez całą noc | 111-035-003             | 1:3000   | 1 godz.        |
| COX II (25kDa)                   | NBP294364 (Rb)         | 1:1000   | Every Blot Bloking Buffer                 | Przez całą noc | 111-035-003             | 1:3000   | 1 godz.        |
| COX IV (17kDa)                   | 4D11B3E8 (Ms)          | 1:1000   | Every Blot Bloking Buffer                 | Przez całą noc | ab6728                  | 1:2000   | 1 godz.        |
| PGC-1 $\alpha$ (91kDa)           | ab191838 (Rb)          | 1:1000   | 5% mleko odtłuszczone rozpuszczone w TBST | 1 godz.        | 111-035-003             | 1:5000   | 1 godz.        |
| IGF-1 (22 kDa)                   | ab9572 (Rb)            | 1:1000   | Every Blot Bloking Buffer                 | 1 godz.        | 111-035-003             | 1:3000   | 1 godz.        |
| proBDNF (28kDa)<br>mBDNF (15kDa) | ab108319 (Rb)          | 1:1000   | Every Blot Bloking Buffer                 | Przez całą noc | 111-035-003             | 1:3000   | 1 godz.        |
| Akt (60kDa)                      | C67E7 (Rb)             | 1:1000   | 5% mleko odtłuszczone rozpuszczone w TBST | Przez całą noc | 111-035-003             | 1:3000   | 1 godz.        |
| pAkt (60kDa)                     | D25E6 (Rb)             | 1:1000   | 5% mleko odtłuszczone rozpuszczone w TBST | Przez całą noc | 111-035-003             | 1:3000   | 1 godz.        |
| NFL (70kDa)                      | C28E10 (Rb)            | 1:1000   | Every Blot Bloking Buffer                 | Przez całą noc | 111-035-003             | 1:3000   | 1 godz.        |
| RBM3 (17kDa)                     | HPA003624 (Rb)         | 1:1000   | Every Blot Bloking Buffer                 | Przez całą noc | 111-035-003             | 1:3000   | 1 godz.        |
| $\beta$ -tubulina (55kDa)        | AF7011 (Rb)            | 1:1000   | Every Blot Bloking Buffer                 | Przez całą noc | 111-035-003             | 1:3000   | 1 godz.        |

Tabela 5. Bufory i materiały wykorzystane w pracy do oznaczeń poziomu wybranych białek metodą Western Blot.

| Nazwa  | Producent<br>(numer katalogowy)  | Skład  | Zastosowanie  |
|--|----------------------------------|--|---|
| Pierce RIPA Buffer                                     | Thermo Scientific, USA (89901)   | 25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % deoksycholan sodu, 0,1 % SDS  | Bufor do homogenizacji tkanek, stosowany również do przygotowania odpowiednich rozcieńczeń  |
| Halt™ Protease i Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X) | Thermo Scientific, USA (1861280) | Fluorek sodu, ortowanadan sodu, beta-glicerofosforan, pirofosforan disodu, aptrotylina, bestatyna, E64, leupeptyna   | Protekcja białek podczas homogenizacji materiału biologicznego                              |
| Pierce BCA Protein Assay Kit                           | Thermo Scientific, USA (23225)   | --   | Określenie poziomu białka w lizatach  |
| Mini protean TGX Precast Protein Gels                  | BioRad, USA (4561035, 4561045)   | Żele poliakryloamidowe   | Rozdział zdenaturowanych białek podczas elektroforezy                                       |
| 10x Tris/Glycine/SDS Running Buffer                    | BioRad, USA (1810732)            | 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1 % SDS, pH 8.3  | Koncentrat buforu do elektroforetycznego rozdzielania białek                                |
| 2x Laemmli Sample Buffer                               | BioRad, USA (1610737)            | 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8, 26,3 % glicero, 12,1 % SDS, 0,01% błękit bromofenolowy   | Bufor do przygotowania próbek i ich denaturacji   |
| Dithiotreitol (DTT)                                    | VWR International, USA (443853B) | 1,4-Dithiotreitol 99 %   | Redukcja białka, w celu ułatwienia wiązania z przeciwciałem                                 |
| Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Stiards     | BioRad, USA (1610376)            | Białka rekombinowane znakowane <i>Strep</i> , 30 % glicerol, 62,5 mM Tris, pH 6,8, 50 mM DTT, 5 mM EDTA, 2% SDS, 0,02 % NaN <sub>3</sub> , 0,01 % błękit bromofenolowy | Marker wielkości białek do rozdzielania elektroforetycznego o zakresie 10-250 kDa           |
| Immun-Blot PVDF Membrane                               | BioRad, USA (1620174)            | --   | Zapewnienie wiązania specyficznych białek podczas transferu z żelu                          |
| Extra Thick Blot Filter Paper                          | BioRad, USA (1703966)            | --   | Zapewnienie szybkiego i skutecznego transferu białek z żelu na membranę.                    |
| Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer                    | BioRad, USA (10026938)           | Tris, Glicyna  | Koncentrat buforu do transferu, umożliwia skuteczne przeniesienie białek z żelu na membranę |



|                               |                        |  |  |
|-------------------------------|------------------------|--|--|
| Every Blot Blocking Buffer    | BioRad, USA (12010020) | Skład niedostępny                                    | Bufor blokujący zmniejszający wiązanie nieswoistych przeciwciał w celu zmniejszenia tła podczas detekcji chemiluminescencyjnej |
| Bufor TBST                    | --                     | 20 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH 7,4 | Bufor stosowany do przemywania membran PVDF  |
| Clarity Western ECL Substrate | BioRad, USA (1705061)  | Odczynnik Ponad-tlenkowy, Odczynnik z Luminolem      | Odczynnik do detekcji wyznaczonych białek  |

### 7.7. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana przy użyciu programu GraphPad Prism 8.3 (GraphPad Software, USA). Do oceny wyników mas hipokampów, stężenia witaminy D oraz poziomów wybranych białek metodą Western Blot z chemiluminescencją zastosowano jednoczynnikową ANOVA z testem post hoc LSD Fishera. Do analizy wyników kinetyki enzymatycznej oraz testów immunozymatycznych zastosowano również jednokierunkową ANOVA z testem post hoc LSD Fishera. Dane zostały przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM, a za wartości statystycznie istotne uznano  $p \leq 0,05$ .

## 8. Wyniki

### 8.1. Stężenie 25(OH)D<sub>3</sub> i metabolitów witaminy D w surowicy szczurów

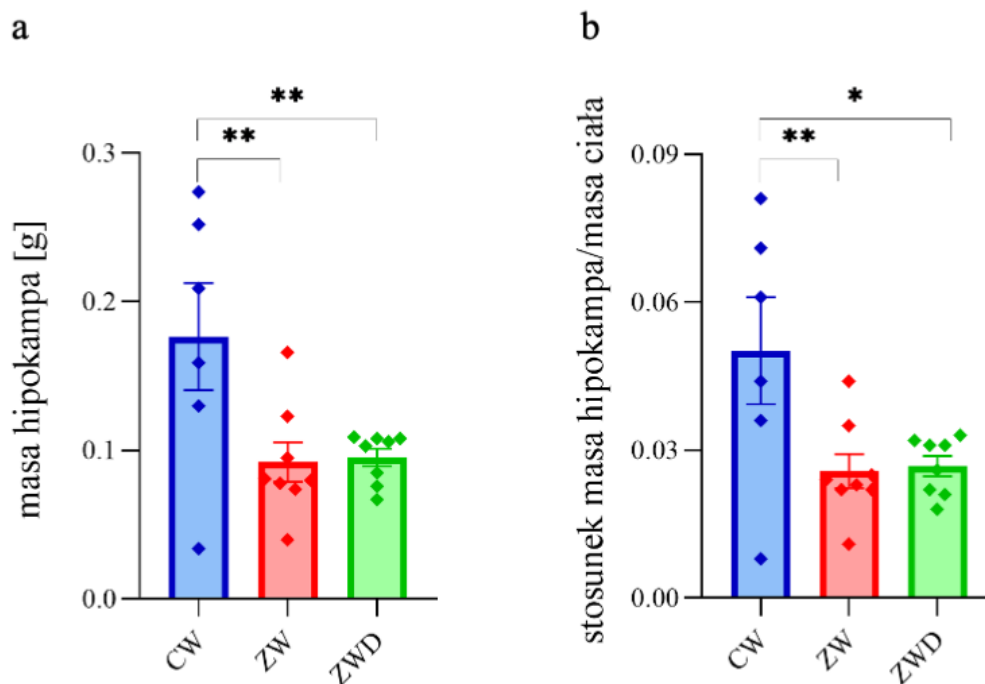
Wyniki stężeń metabolitów witaminy D w surowicy szczurów traktowanych cyklicznie stresorem zimna oraz suplementowanych witaminą D<sub>3</sub> zostały przedstawione oraz obszernie opisane w artykule Karnia i wsp. (2021). W grupie suplementowanej ZWD (w artykule STR SUP) zaobserwowano istotnie wyższe stężenie 25(OH)D<sub>3</sub> (22,89 ± 6,02 ng/ ml) w porównaniu do grupy ZW poddanej czynnikowi stresowemu (w artykule STR PL; 10,36 ± 2,92 ng/ ml) i CW będącą grupą pozorowaną (w artykule SHM) (7,84 ± 2,80 ng/ ml). Wykazano brak różnic w stężeniu 25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, epi-25(OH)D<sub>3</sub> w grupie ZW w porównaniu z grupą CW.

### 8.2. Masa hipokampa i masa ciała szczurów

Po 28-dniowej ekspozycji szczurów na stresor zimna obserwuje się istotny statystycznie (\*\*p ≤ 0,01) spadek masy hipokampów u szczurów w grupie ZW (0,092 ± 0,019) oraz ZWD (0,095 ± 0,017) w porównaniu do grupy CW (0,176 ± 0,044 g), natomiast między grupami ZW i ZWD nie obserwuje się istotnych różnic (Rycina 8a).

W wynikach pomiarów masy ciała zwierząt nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami. Szczegółowe wyniki zostały zaprezentowane w artykule Karnia i wsp. (2021) zawartym w podrozdziale 7.1.

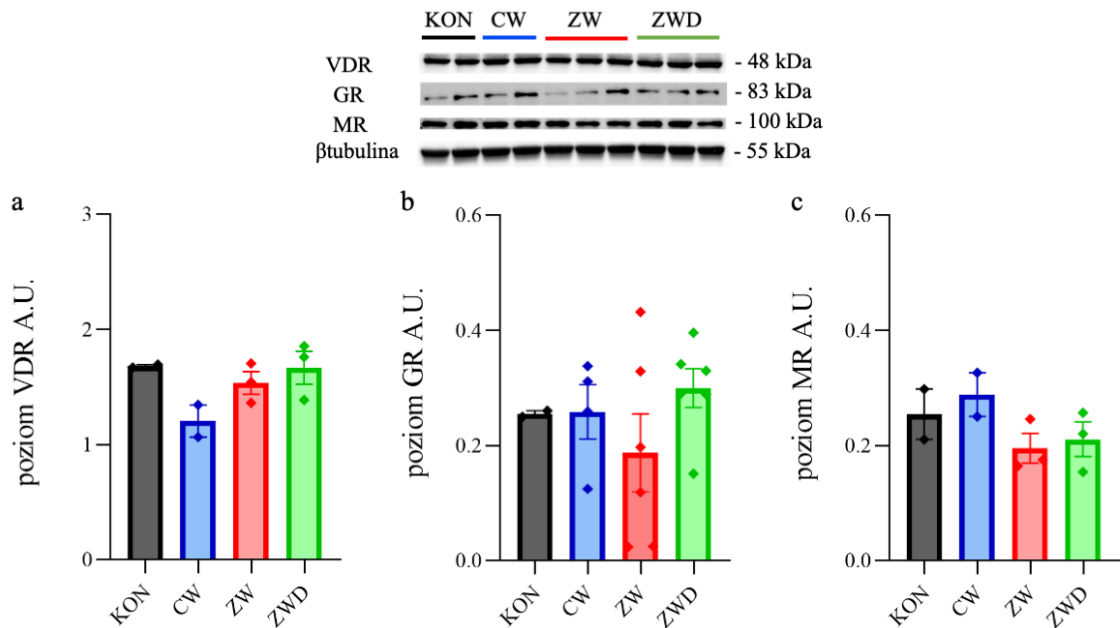
Zaobserwowano różnice w stosunku masy hipokampa do masy ciała szczurów. W grupie ZW (0,02 ± 0,01) był on znacząco niższy (\*\*p ≤ 0,01) w porównaniu do CW (0,05 ± 0,01), natomiast w przypadku grupy ZWD (0,03 ± 0,00) spadek był nieco mniejszy (\*p ≤ 0,05 vs. CW) (Rycina 8b).



Rycina 8. Masa hipokampa (a) oraz stosunek masy hipokampa do masy ciała (b) w poszczególnych grupach: u szczurów z grupy pozornego stresu zimna (CW), grupy traktowanej stresorem w postaci zimna (ZW) oraz dodatkowo suplementowanej witaminą D<sub>3</sub> (ZWD). Wyniki zostały wyrażone jako średnia ± SEM; \**p* ≤ 0,05; \*\**p* ≤ 0,01.

### 8.3. Ocena poziomu receptorów VDR, MR oraz GR

Po 28-dniowej suplementacji witaminy D<sub>3</sub> podczas powtarzanego, długotrwałego zanurzenia w wodzie nie zaobserwowano znacznych zmian w poziomach VDR w hipokampach szczurów. W grupie KON wynosiły one  $1,680 \pm 0,016$  w CW  $1,206 \pm 0,140$  natomiast w grupach ZW i ZWD kolejno:  $1,538 \pm 0,121$  i  $1,668 \pm 0,175$  A.U. (Rycina 9a). Jak przedstawia Rycina 9b, nie uzyskano również istotnych różnic w poziomach GR. Poziom badanego białka w grupach: KON ( $0,255 \pm 0,005$ ), CW ( $0,259 \pm 0,067$ ), ZW ( $0,188 \pm 0,188$ ) oraz z włączoną suplementacją witaminy D<sub>3</sub> ( $0,300 \pm 0,059$  A.U.) był do siebie zbliżony. Co więcej, nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic w poziomach MR. W grupach KON, CW, ZW i ZWD poziom ten był zbliżony i wynosił kolejno:  $0,254 \pm 0,044$ ,  $0,288 \pm 0,038$ ,  $0,195 \pm 0,031$  i  $0,211 \pm 0,037$  A.U. (Rycina 9c).



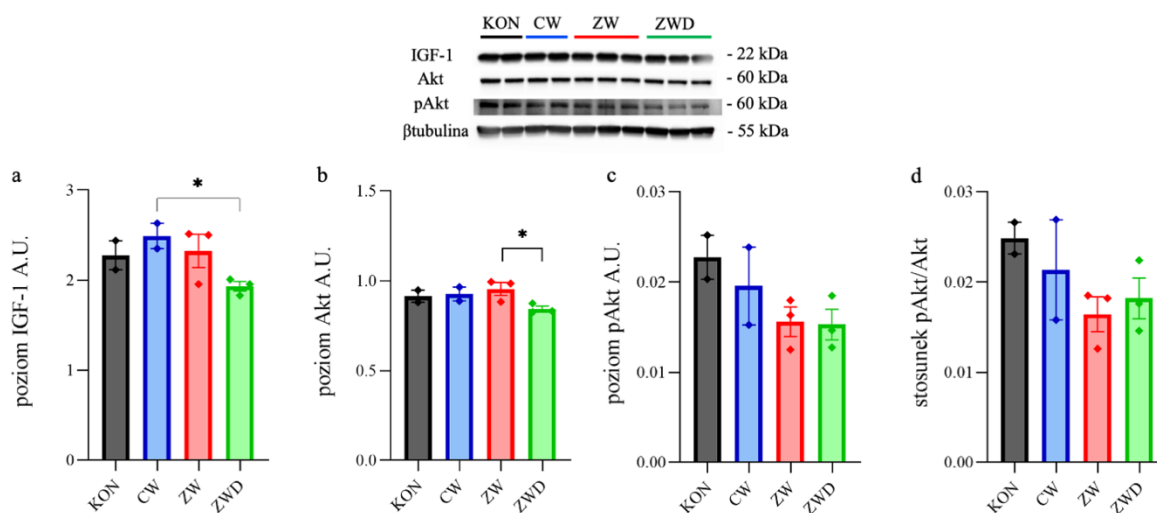
Rycina 9. Poziomy receptora VDR (a) i GR (b) w hipokampie szczurów. **Skróty:** KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowana witaminą D<sub>3</sub>. Wyniki zostały wyrażone, jako średnia  $\pm$  SEM.

#### 8.4. Zawartość białek związanych z neuroprotekcją

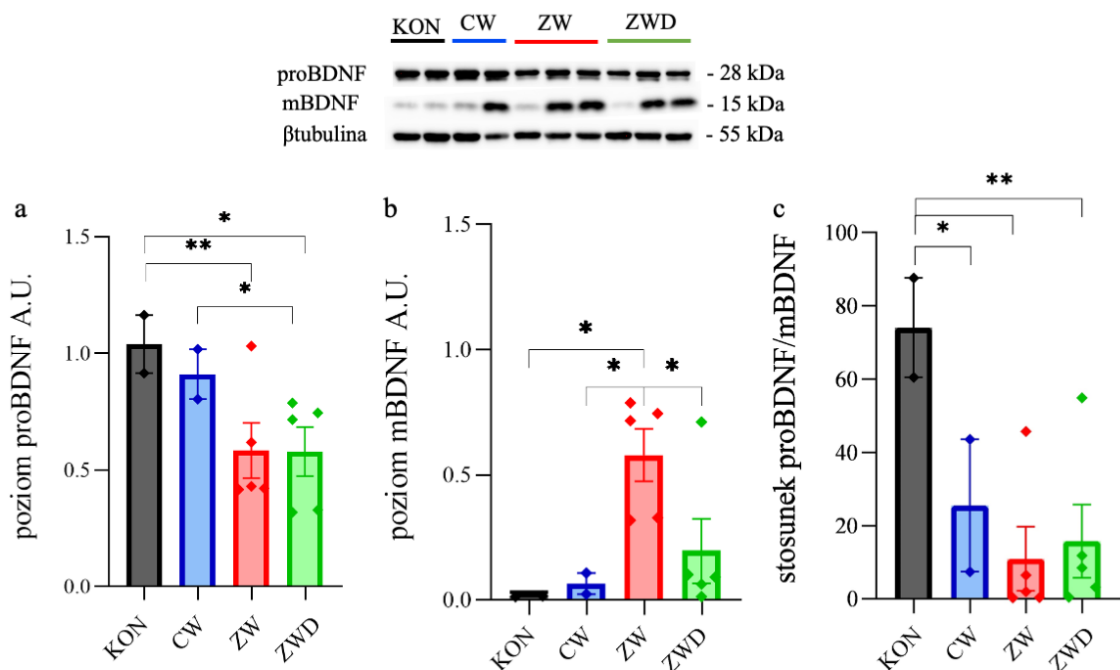
Na rycinie 10 i 11 przedstawiono wyniki poziomów białek zaangażowanych w szlaki wzrostu, przetrwania neuronów i związanych z neurogenezą. W poziomie IGF-1 obserwuje się istotny spadek ( $*p \leq 0,05$ ) w grupie ZWD ( $1,933 \pm 0,064$ ) w porównaniu do CW ( $2,492 \pm 0,139$ ). Jednakże, w grupie ZW ( $2,324 \pm 0,225$ ) nie obserwuje się znacznych różnic w porównaniu do KON ( $2,277 \pm 0,162$  A.U.) oraz pozostałych grup (Rycina 10a). Ponadto, po 28-dniowej, cyklicznej ekspozycji na zimno oraz suplementacji witaminą D<sub>3</sub> zaobserwowano istotny spadek ( $*p \leq 0,05$ ) w poziomie Akt w hipokampach szczurów w grupie ZWD ( $0,844 \pm 0,018$ ) w porównaniu do grupy niesuplementowanej (ZW;  $0,954 \pm 0,044$  A.U.). Wyniki dla grupy KON i CW wynoszą odpowiednio:  $0,914 \pm 0,033$  oraz  $0,927 \pm 0,039$  A.U. (Rycina 10b). Co więcej, w poziomach pAkt w grupie ZW ( $0,016 \pm 0,002$ ), jak również suplementowanej witaminą D<sub>3</sub> (ZWD;  $0,015 \pm 0,002$ ) obserwowany jest znaczny spadek ( $**p \leq 0,01$ ) w porównaniu do KON ( $0,023 \pm 0,002$  A.U.). W grupie CW wartości wynoszą  $0,020 \pm 0,004$  A.U. (Rycina 10c). Na Rycinie 10d przedstawione są wyniki stosunku pAkt do Akt, gdzie między grupami nie obserwuje się istotnych różnic.

Wartości dla stosunku pAkt/Akt kolejno wynoszą w grupach KON, CW, ZW, ZWD:  $0,025 \pm 0,002$ ;  $0,021 \pm 0,006$ ;  $0,016 \pm 0,002$ ;  $0,018 \pm 0,003$  A.U.

Po 28-dniowej suplementacji witaminą D<sub>3</sub> w warunkach cyklicznej ekspozycji na zimno zauważono istotny ( $*p \leq 0,05$ ) wzrost w poziomie mBDNF ( $0,574 \pm 0,452$  A.U.) w grupie ZW względem pozostałych grup. Wartości poziomu tego białka w grupach KON, CW, ZWD wynoszą kolejno:  $0,014 \pm 0,001$ ,  $0,066 \pm 0,042$  i  $0,196 \pm 0,205$  A.U. (Rycina 11b). Obserwuje się także znaczące obniżenie poziomu proBDNF ( $**p \leq 0,01$ ) w grupie ZW ( $0,584 \pm 0,187$  A.U.), jak również w ZWD ( $*p \leq 0,05$ ;  $0,580 \pm 0,166$ ) w porównaniu do grupy KON ( $1,040 \pm 0,124$  A.U.), co przedstawiono na Rycinie 11a. Ponadto wykazano również różnicę poziomu proBDNF w grupie ZW względem grupy CW ( $*p \leq 0,05$ ;  $0,911 \pm 0,107$  A.U.). Zaobserwowano istotne zmiany między grupami w stosunku proBDNF/mBDNF (Rycina 11c). Wartości kolejno w grupach KON, CW, ZW, ZWD wynoszą:  $74,059 \pm 13,555$ ;  $25,511 \pm 18,082$ ;  $10,993 \pm 13,870$ ;  $15,813 \pm 15,802$  A.U.



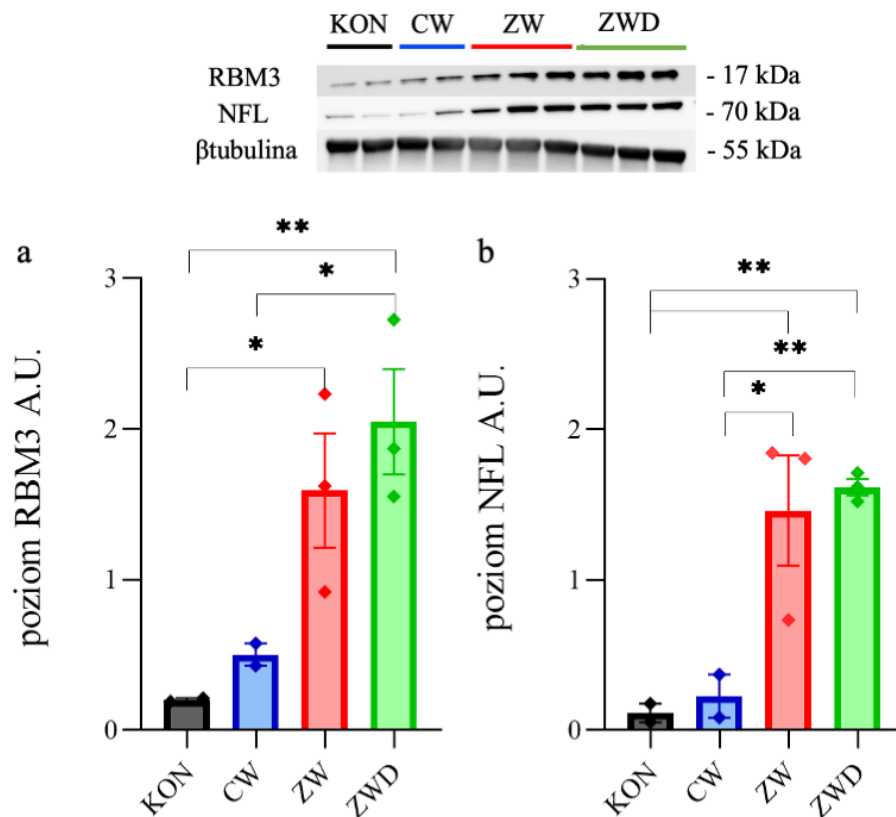
Rycina 10. Poziomy IGF-1 (a), Akt (b), pAkt (c) oraz stosunek poziomów pAkt/Akt (d) w hipokampie szczurów. **Skróty:** KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowana witaminą D<sub>3</sub>. Wyniki zostały wyrażone, jako średnia  $\pm$  SEM;  $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ .



Rycina 11. Poziomy mBDNF (a), proBDNF (b) oraz stosunek poziomów proBDNF/mBDNF (c) w hipokampie szczurów. **Skróty:** CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowanej witaminą D<sub>3</sub>. Wyniki zostały wyrażone, jako średnia ± SEM; \*p ≤ 0,05.

### 8.5. Poziomu RBM3 i NFL w hipokampie

Powtarzana, 28-dniowa ekspozycja na 60-minutowy stresor zimna miała istotny wpływ na poziom RBM3 i NFL w hipokampie. Zarówno w grupie ZW (\*p ≤ 0,05 vs. KON), jak i ZWD (\*\*p ≤ 0,01 vs. CW; \*p ≤ 0,05 vs. KON), obserwowany jest znaczny wzrost poziomu RBM3. W grupie ZW wynosił on 1,590 ± 0,464, natomiast w ZWD: 2,048 ± 0,429 A.U. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic między grupą KON i CW (kolejno 0,201 ± 0,011; 0,502 ± 0,073 A.U.) (Rycina 12a). Co więcej w poziomie NFL również wykazano różnice istotne statystycznie w grupie poddanej ekspozycji na zimno (ZW vs. CW, \*p ≤ 0,05; ZW vs. KON, \*\*p ≤ 0,01). Ponadto obserwowano również wzrost w grupie suplementowanej witaminą D<sub>3</sub> względem grup kontrolnych (ZWD vs. CW, \*\*p ≤ 0,01; ZWD vs. KON, \*\*p ≤ 0,01). Wyniki dla grupy ZW i ZWD prezentują się następująco: kolejno 1,461 ± 0,446; 1,617 ± 0,067 A.U. Nie zaobserwowano żadnych różnic między grupami KON (0,115 ± 0,062) i CW (0,227 ± 0,143 A.U.) (Rycina 12b).

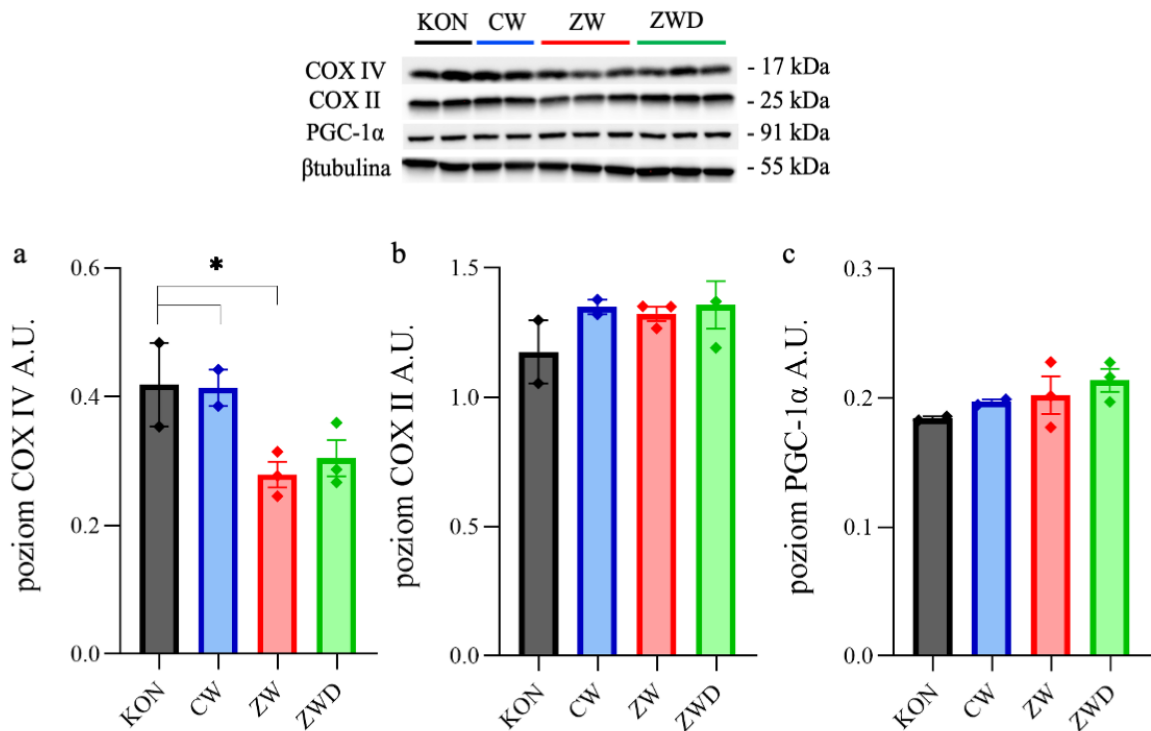


Rycina 12. Poziomy RBM3 (a) oraz NFL (b) w hipokampie szczurów. **Skróty:** KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresorem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowana witaminą D<sub>3</sub>. Wyniki zostały wyrażone, jako średnia ± SEM; \**p* ≤ 0,05; \*\**p* ≤ 0,01.

## 8.6. Poziomy białek mitochondrialnego metabolizmu tlenowego

Poniżej przedstawiono wpływ 28-dniowej suplementacji witaminy D<sub>3</sub> podczas ekspozycji na zimno, na poziomy markerów tlenowego metabolizmu energetycznego. Zawartość podjednostki IV (kodowanej w genomie jądrowym) COX w grupie ZW ( $0,279 \pm 0,024$ ) różniły się istotnie w odniesieniu do KON ( $0,419 \pm 0,065$ ) oraz do CW ( $0,414 \pm 0,028$  A.U.) (\**p* ≤ 0,05). Jednakże mimo tendencji spadkowej w grupie ZWD ( $0,305 \pm 0,034$  A.U.) nie zaobserwowano znaczących statystycznie różnic (Rycina 13a). Również nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w poziomach podjednostki II (kodowanej przez mDNA) COX oraz PGC-1 $\alpha$ . Wyniki poziomów COX II przedstawiono na rycinie 13b. Wartości poziomów w hipokampie wynoszą kolejno w grupie KON, CW, ZW i ZWD:  $1,176 \pm 0,122$ ,  $1,349 \pm 0,029$ ,  $1,323 \pm 0,035$ ,  $1,358 \pm 0,113$  A.U. Ponadto przedstawione wyniki poziomu PGC-1 $\alpha$  (Rycina 13c) w hipokampie szczurów wystawionych na powtarzający się stresor zimna również nie wykazują statystycznie

istotnych różnic. W grupie KON, CW, ZW i ZWD, wartości wynoszą kolejno:  $0,184 \pm 0,002$ ,  $0,197 \pm 0,002$ ,  $0,202 \pm 0,018$ ,  $0,214 \pm 0,011$  A.U.

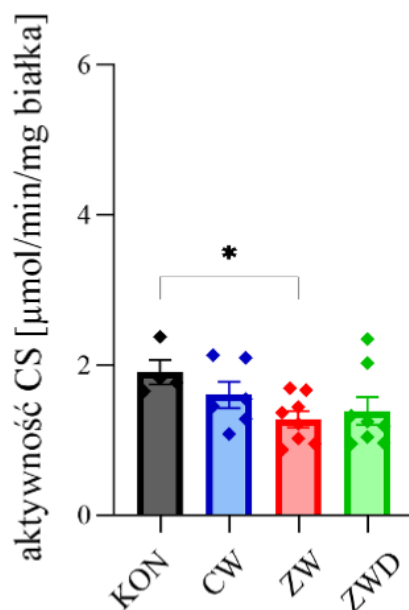


Rycina 13. Poziom COX IV (a), COX II (b) oraz PGC-1α w hipokampie szczurów. **Skróty:** KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresorem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowana witaminą D<sub>3</sub>. Wyniki zostały wyrażone, jako średnia ± SEM; \* $p \leq 0,05$ .

### 8.7. Aktywność enzymów mitochondrialnego metabolizmu tlenowego

Po 28-dniowym wystawieniu zwierząt na stresor zimna zaobserwowano istotne statystycznie zmiany (\* $p \leq 0,05$ ) w aktywności CS między grupą kontrolną (KON;  $1,90 \pm 0,23$ ) oraz grupą ZW ( $1,28 \pm 0,22$ ). W pozostałych grupach, to jest, suplementowanej witaminą D<sub>3</sub> (ZWD;  $1,39 \pm 0,37$ ), jak również pozornego zanurzenia w zimnej wodzie (CW:  $1,60 \pm 0,30$  μmol/min/mg białka) nie zaobserwowano istotnych różnic (Rycina 14).



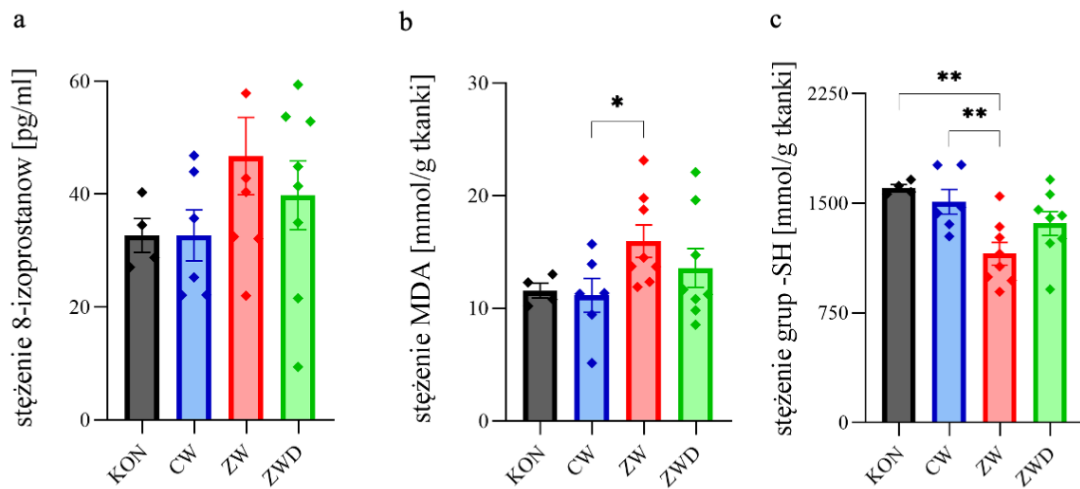


Rycina 14. Aktywności syntazy cytrynianowej (CS) w hipokampie szczurów. **Skróty:** KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresorem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowana witaminą  $D_3$ . Wyniki zostały wyrażone, jako średnia  $\pm$  SEM.

### 8.8. Oznaczanie markerów uszkodzeń wolnorodnikowych w hipokampie

W kolejnych analizach zaobserwowano, że 28-dniowe długotrwałe zanurzenie w zimnej wodzie powoduje istotne uszkodzenia białek (grupy -SH) i lipidów (MDA) wywołane RFT w hipokampach szczurów. Jednakże w zawartości 8-izoprostanów (Rycina 15a) nie obserwuje się znaczących zmian pomiędzy grupami KON, CW, ZW, ZWD, kolejno  $32,65 \pm 4,25$ ,  $32,69 \pm 7,83$ ,  $46,73 \pm 13,70$  i  $39,80 \pm 12,12$  pg/ml. Jak przedstawia Rycina 15b, uzyskano istotne różnice ( $*p \leq 0,05$ ) w stężeniu MDA w grupie ZW ( $15,99 \pm 2,87$ ) w odniesieniu do grupy CW ( $11,15 \pm 2,59$ ). W grupie KON ( $11,60 \pm 0,92$ ) i z włączoną suplementacją witaminy  $D_3$  (ZWD;  $13,58 \pm 3,44$  mmol/g tkanki) stężenie oznaczanego markera wolnorodnikowych uszkodzeń lipidów było zbliżone. Co więcej, stwierdzono również różnice statystycznie istotne ( $**p \leq 0,01$ ) w zawartości markera uszkodzeń białek spowodowanych stresem oksydacyjnym. W grupie ZW ( $1155,2 \pm 154,5$ ) obserwuje się spadek stężenia grup -SH względem KON

(1605,1 ± 31,8) oraz CW (1510,1 ± 146,3), czego nie wykazano dla grupy ZWD (1361,4 ± 165,5 mmol/g tkanki) (Rycina 15c).



Rycina 15. Rycina 15. Stężenie 8-izoprostanów (a), MDA (b), grup -SH (c) w hipokampie szczurów. **Skróty:** KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego zanurzenia w zimnej wodzie, ZW – grupa traktowana stresem zimna, ZWD – grupa zanurzona w zimnej wodzie i suplementowana witaminą D<sub>3</sub>, MDA – aldehyd dimalonalowy, grupy -SH – grupy sulfhydrylowe. Wyniki zostały wyrażone jako średnia ± SEM; \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01.

## **9. Dyskusja**

Głównym celem realizacji niniejszych badań była chęć poznania i zrozumienia wewnątrzkomórkowych mechanizmów protekcyjnych witaminy D. W przedstawionej pracy poruszyłam temat wpływu suplementacji witaminy D<sub>3</sub> na neuroprotekcję i mitochondrialny metabolizm energetyczny w hipokampach szczurów podczas długotrwałej ekspozycji na działanie glikokortykosteroidów. Niniejsza praca skupia się na dwóch różnych modelach narażenia organizmu na działanie glikokortykosteroidów: w formie egzogenego 28 dniowego podawania DEXA oraz poprzez modelowo indukowane uwalnianie endogennych GK w wyniku zastosowania długotrwałej ekspozycji na zimno.

### **9.1. Długotrwała ekspozycja na działanie DEXA**

Dyskusja dla tej części dysertacji została przedstawiona w artykułach: „The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy” oraz „Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats”.

### **9.2. Długotrwała ekspozycja na działanie endogennych GK**

#### **9.2.1. Zmiany atroficzne hipokampa w wyniku działania endogennych GK**

GK wykazują działanie kataboliczne, powodują hamowanie syntezy białek i stymulację ich degradacji w tkankach pozawątrobowych, szczególnie w mięśniach szkieletowych i tkance kostnej (Sato i wsp., 2018). W pracy Karnia i współautorzy przedstawiają, że pod wpływem stymulacji elektrycznej jądra łożyskowego prążka krańcowego, które odgrywa istotną rolę w aktywacji osi PPN, obserwowane jest zależne od GK rozregulowanie w górę białek atrofii mięśni szkieletowych i tlenowego metabolizmu energetycznego (Karnia i wsp., 2020).

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wykazują, że 28 dniowa ekspozycja na działanie GK indukowana zimnem powoduje obniżenie masy hipokampa przy jednoczesnym wzroście kortykosteronu (KORT) w osoczu. Wyniki te są zgodne z danymi

uzyskanymi przez Zhang i wsp., wykazującymi znaczne obniżenie objętości hipokampa u myszy po 4 tygodniowym podawaniu KORT w dawce 20 mg/kg/dzień (Zhang i wsp., 2015). W innych badaniach zaobserwowano również obniżenie objętości hipokampa u szczurów z wyindukowaną hiperkortyzolemią (Schubert i wsp., 2008). Przyczyną tego stanu jest fakt, iż długotrwała ekspozycja na zwiększone poziomy glikokortykosteroidów wpływa na obniżenie długość dendrytów, atrofię neuronów i w konsekwencji może prowadzić do apoptozy komórek (Sapolsky, 1996). Mimo, iż w przedstawionej pracy nie zostały ujęte testy behawioralne, sugeruje się, że atrofia hipokampa jest dobrze ugruntowanym biomarkerem zaburzeń poznawczych (Rahman i wsp., 2016; Sun i wsp., 2022). Według licznych badań, zanurzenie w zimnej wodzie związane jest z procesami zaburzenia uwagi i pamięci (Jones i wsp., 2019; Mahoney i wsp., 2007; O'Brien i wsp. 2007).

Wyniki badań prezentowane w niniejszej dysertacji wykazują również, wzrost poziomu NFL w hipokampie spowodowany ekspozycją na zimno zarówno w grupie ZW, jak i ZWD. W pracy Cereseto i wsp. wykazano, że po 21 dniach ekspozycji na działanie KORT (wydzielanie przez podskórny implant zawierający 100 mg i 200 mg) powoduje obniżenie poziomu NFL w hipokampie (Cereseto i wsp., 2006). Różnice w wynikach mogą być skutkiem zastosowania innego modelu, jak również poziomu krążącego KORT we krwi zwierząt. Z drugiej strony w badaniach prowadzonych *post mortem* przedstawiono zwiększoną immunoreaktywność NFL w korze mózgowej i zakręcie hipokampa u pacjentów z otępieniem w chorobie Parkinsona (Frigerio i wsp., 2023). NFL gromadził się w somie neuronów o morfologii charakterystycznej dla zmian neurodegeneracyjnych oraz w aksonach podlegających fragmentacji (Frigerio i wsp., 2023). W ostatnich latach prowadzone badania, skupiają się głównie na oznaczeniu poziomu uwolnionego NFL do krwioobiegu, czy też płynu mózgowo-rdzeniowym odzwierciedlając uszkodzenia i zwyrodnienia aksonów w chorobach neurodegeneracyjnych (Zervides i wsp., 2022). Powszechnie uważa się, że rozpad aksonów prowadzi do wzrostu tego markera w płynie zewnątrzkomórkowym i w konsekwencji obniżenia w tkance mózgowej (Ashton i wsp., 2019). Między innymi w jednej z prac, wykazano, że wzrost poziomu NFL we krwi oraz płynie mózgowo-rdzeniowym korelował z atrofią mózgu i rdzenia kręgowego (Barro i wsp., 2018). Jednakże, wyższą immunoreaktywność NFL opisano w tkance mózgowej zwierząt i u pacjentów po udarze (Härtig i wsp., 2016; Mages i wsp. 2018).

28 dniowa ekspozycja na zimno spowodowała wzrost poziomu RBM3 w hipokampie szczurów. Wykazano, że białko to powoduje trwałą ochronę synaptyczną u myszy z chorobą neurodegeneracyjną (Peretti i wsp., 2015). Co więcej, białko to zostało zaproponowane jako marker hipotermii terapeutycznej o działaniu neuroprotekcijnym (Rosenthal i wsp., 2019). Jednakże, wymagane jest pełne zrozumienie mechanizmów RBM3-zależnych. Mimo wielu badań świadczących o pozytywnym potencjale RBM3 dane nie wydają się być jednoznaczne. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy są zbieżne z tymi uzyskanymi, przez Lian i wsp., gdzie autorzy wykazali, że stres spowodowany zimnem indukuje wzrost poziomu RBM3 w hipokampie samic szczurów (Lian i wsp., 2018). Istnieje wiele badań popierających zależność tego białka szoku zimna i działaniem neuroprotekcijnym (Bastide i wsp., 2017; Chip i wsp., 2011; Lin i wsp., 2023), między innymi poprzez receptor TrkB (Peretti i wsp., 2021). Mechanizm ten pośrednio obserwuje się w hipokampach z grupy ZW, gdzie poziom mBDNF był istotnie podwyższony, natomiast poziom proBDNF został obniżony w obu grupach poddanych ekspozycji na zimno. Prezentowane wyniki są zgodne z badaniami Lian i wsp. gdzie 7 dniowy stres spowodowany zimnem przyczynił się do obniżenia poziomu BDNF (proBDNF) w hipokampie samic szczurów (Lian i wsp., 2018). Zgodność niniejszych badań można również wskazać dla wzrostu poziomu mBDNF indukowanego ekspozycją na zimno w hipokampie. W badaniach zespołu Peretti'ego zauważono podobny wynik w badaniach *in vivo*. Obniżenie temperatury ciała myszy do 16-18°C na 45 minut spowodowało wzrost poziomu BDNF (mBDNF), jak również podwyższenie poziomu RBM3 w hipokampie zwierząt (Peretti i wsp., 2021).

### **9.2.2. Wpływ endogennych GK na indukcję stresu oksydacyjnego w hipokampie**

Hipokamp, ciało migdałowate, kora przedczołowa i komórki ziarniste mózdzku są uznawane za struktury charakteryzujące się największą podatnością na stres oksydacyjny (Wang i Michaelis, 2010). Struktury te są istotne dla procesów uczenia się i pamięci oraz ich integracji (Eichenbaum, 2001; Nieuwenhuis i Takashima, 2011). A wysoki poziom stresu oksydacyjnego koreluje z pogorszeniem się ich funkcji (Carney i wsp., 1991; Fukui i wsp., 2001).

Według dostępnej literatury wysokie stężenia GK w osoczu wiąże się ze zwiększonym stresem oksydacyjnym (Karnia i wsp., 2018), co zostało potwierdzone w niniejszych badaniach. Wykazałam, że ekspozycja na zimno powoduje wzrost poziomu MDA i spadek grup -SH w hipokampie, wskazując na uszkodzenia lipidów i białek spowodowane stresem. Wyniki niniejszych badań są zbieżne z obserwacjami Xu i wsp., gdzie przedstawiają oni wzrost poziomu MDA i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) wraz z długością czasu ekspozycji na zimno. Najwyższy poziom zarówno MDA jak i SOD był obserwowany w trzecim tygodniu eksperymentu. Co więcej wzrost poziomu CORT wywołany zimnem spowodował aktywację endogennego szlaku apoptotycznego i utraty neuronów (Xu i wsp., 2019). Ponadto w badaniach Bakhtiari-Dovvombaygi i wsp. w szczurzym modelu nieprzewidywalnego przewlekłego stresu po 4 tygodniach zaobserwowano obniżenie stężenia grup -SH oraz istotny wzrost MDA w hipokampie, przedstawiając związek między GK a wolnorodnikowymi uszkodzeniami OUN (Bakhtiari-Dovvombaygi i wsp., 2021).

Wpływ ekspozycji zimna na mitochondrialny metabolizm energetyczny nie jest dokładnie poznany. W niniejszej pracy wykazano, że 28 dniowa ekspozycja na zimno powoduje obniżenie zawartości podjednostki IV COX i aktywności CS, podobnie jak w pracy Pamentera i wsp., gdzie odnotowano obniżenie aktywności CS, jak również kompleksu IV łańcucha oddechowego o 55% (Pamenter i wsp., 2018). Wykazano również, że GK, zmniejszają stopień kontroli oddychania poprzez hamowanie aktywności kompleksu I i V w mitochondriach mózgu szczura (Morin i wsp., 2000). W innych badaniach przedstawiono, że model chronicznego nieprzewidywalnego łagodnego stresu, jak i traktowanie szczurów KORT w dawce 20 mg/ kg przez 40 dni wpływają w podobnym stopniu na dysfunkcję mitochondriów. W izolowanych mitochondriach kory przedczołowej obu grup zaobserwowano znacząco obniżony stosunek GSH/GSSG, obniżony potencjał błonowy, zwiększoną produkcję RFT i zmniejszona aktywność enzymatyczna kompleksu I i IV łańcucha oddechowego oraz CS (Liu i Zhou, 2012). W innym modelu stresu (pustej butelki na wodę), wykazano, że po 21 dniach obniżenie zawartości kompleksów łańcucha oddechowego (I-IV) oraz PGC-1 $\alpha$  w przyśrodkowej korze przedczołowej oraz ciele migdałowatym (Zhao i wsp., 2023). Informacje te sugerują, że niezależnie od rodzaju stresora, odpowiedź mitochondriów na działanie GC jest podobna. Co więcej, wykazano, że 21-dniowa ekspozycja na zimno hamuje fosforylację AMPK i promuje fosforylację mTOR,

118

kluczowych w regulacji homeostazy energetycznej komórek. Zmniejsza ekspresję genów kodujących podjednostki kompleksu I (*Ndufv1* i *Ndufv2*) oraz wpływa na hamowanie CKT – hydratazy fumaranowej (*Fhl1*) i ligazy bursztynian-CoA (*Suclg2*). Jednakże, w przeciwieństwie do przedstawionych wyników, aktywność mitochondrialnego kompleksu IV nie uległa zmianie w hipokampie myszy (Li i wsp., 2024). W innych badaniach prenatalna ekspozycja na działanie DEXA spowodowała u zwierząt obniżenie zawartości kompleksu II, III i V łańcucha oddechowego w korze czołowej, lecz nie wykazano żadnych zmian w hipokampie (Trojan i wsp., 2023). Różnica może wynikać z zastosowanego modelu badań, wykorzystanych metod diagnostycznych, jak również mogą być powiązane ze zmianami związanymi z dynamiką mitochondriów. W pracy Dzik i wsp., wykazali związek pomiędzy aktywnością CS i poziomem PGC-1 $\alpha$ , jako pośrednim markerem biogenezy mitochondriów (Dzik i wsp., 2019). Mimo, że w niniejszym badaniu nie zauważono istotnych zmian w poziomie PGC-1 $\alpha$  to aktywności CS oraz zawartości COX IV w hipokampie zostały znacząco obniżone w odpowiedzi na ekspozycje na zimno. Wyniki te wskazują na zmniejszenie mitochondrialnego metabolizmu energetycznego, świadczącym o dysfunkcji mitochondriów.

Prezentowane niedobory związane z obniżeniem poziomemu białek oraz aktywności enzymów tlenowego metabolizmu mitochondrialnego, podczas przedłużonej ekspozycji na działanie GK, przyczyniają się do rozwoju stresu oksydacyjnego. Bazując na dotychczasowej wiedzy, zmiany te mogą być powiązane z zaburzeniami metabolizmu glukozy w neuronach. Ponadto mogą wpływać na nieprawidłowość w funkcji neuronów, związanych z zapotrzebowaniem energetycznym (Harris i wsp., 2012).

### **9.2.3. Potencjał ochronny witaminy D w warunkach długotrwałej ekspozycji na działanie endogennych GK**

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się roli witaminy D w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie ma wpływać na neuroprotekcję, neurogenezę oraz produkcję i modulację neurotrofin (Pierrot-Deseilligny i Souberbielle, 2017). Jednak jej skuteczność w modulowaniu zmian neurofizjologicznych związanych z działaniem glikokortykosteroidów ciągle pozostaje do wyjaśnienia.

Długotrwały niedobór witaminy D może prowadzić do produkcji RFT i negatywnego wpływu na funkcjonowanie mitochondriów, co z kolei prowadzi do

stanów atroficznych (Dzik i Kaczor, 2019). Wykazano, że niedobór witaminy D jest powiązany z atrofią mięśni szkieletowych (Dzik i wsp., 2018), mózgowia i niektórych struktur, w tym hipokampa (Al-Amin i wsp., 2019; Eyles i wsp., 2003). Mimo, iż w grupie wystawionej na długotrwałą ekspozycję na zimno do owego niedoboru pod wpływem GK nie dochodzi to negatywne skutki przewlekłej ekspozycji są obserwowane. Jak wspomniałam wyżej, w niniejszej pracy, mimo znacznego stężenia 25(OH)D<sub>3</sub> w osoczu, suplementacja witaminy D<sub>3</sub> nie ochroniła hipokampa przed obniżeniem jego masy w przedstawionym modelu. Jednakże sugeruje się, że prawidłowy poziom 25(OH)D<sub>3</sub> może wpływać nie tyle na zmianę objętości mózgowia i jego struktur, ale powodować poprawę jego funkcji (Zelzer i wsp., 2021).

Ekspozycja na GK powoduje obniżenie poziomu VDR nie tylko w hipokampie, ale również korze czołowej, sercu i nerkach (Jiang i wsp., 2014). W prezentowanych badaniach zarówno ekspozycja na działanie GK, jak i suplementacja witaminy D<sub>3</sub> nie zmieniły poziomu VDR w hipokampie szczurów. Można wnioskować, że jest to efekt braku zmian w stężeniu 25(OH)D<sub>3</sub> we krwi po ekspozycji na zimno w porównaniu do grupy CW. Natomiast dodatkowa suplementacja również nie wpływa na zawartość VDR.

W niniejszej pracy stwierdzono, że długotrwała ekspozycja na zimną wodę po suplementacji witaminą D<sub>3</sub> powoduje obniżenie poziomu IGF-1 względem grupy CW. Zarówno IGF-1, jak i mBDNF aktywują szlak PI3K/Akt (Nitta i wsp., 2004; Ohira i Hayashi, 2009). Dlatego prezentowane wyniki mogą sugerować, że wyrzut endogennych GK w wyniku działania na zimno wpływa zarówno na szlaki sygnałowe BDNF/Akt, jak również IGF-1/Akt. Niektóre wyniki sugerują, że wyciszenie IGF-1/IGF-1R u myszy powoduje obniżenie rozmiaru mózgu, utratę mielinizacji i pogorszenie funkcji poznawczych (Sun i wsp., 2005). Inne badanie wykazało, że podawanie IGF-1 zwiększyło ekspresję BDNF (Park i wsp., 2011). Wyniki te są istotne, gdyż sugerują, że wysoki poziom IGF-1 może promować BDNF a zależność między nimi pozostaje częściowo potwierdzona w niniejszej pracy. Co więcej, w dysertacji wykazano, że długotrwała ekspozycja na zimno powoduje obniżenie poziomu proBDNF, jak również stosunku proBDNF do mBDNF. Jednakże suplementacja witaminą D<sub>3</sub> nie wpływa na zmianę zawartości tych białek. Badania wskazują na prawdopodobnie odmienny mechanizm działania witaminy D i jej metabolitów. Ekspozycja na zimno nie



spowodowała zmian w ich stężeniu, lecz spowodowała znaczną produkcję KORT. Ciekawym aspektem jest interakcja między IGF-1 a witaminą D. Hayakawa i wsp. wykazali, że  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  w mięśniach szkieletowych nie wpływa bezpośrednio na zawartość białka, IGF-1 sugerując, że stymulacja ta może dotyczyć innych tkanek (Hayakawa i wsp., 2015)

Okazuje się, że niedobór witaminy D zmniejsza tempo zużycia tlenu i powoduje zaburzenia funkcji mitochondriów (Dzik i Kaczor, 2019). Można, więc wnioskować, że jej suplementacja może przyczyniać się do poprawy tlenowego metabolizmu energetycznego, co częściowo prezentują niniejsze badania. W niniejszej pracy pod wpływem endogennych GK nie jest obserwowane obniżenie stężenia  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , prawdopodobnie dlatego suplementacja witaminy  $\text{D}_3$  nie jest istotnie efektywna, również w kontekście poprawy aktywności tlenowego metabolizmu energetycznego.

Dzik i wsp. zaobserwowali, że suplementacja witaminą  $\text{D}_3$  wykazuje potencjał antyoksydacyjny i wpływa istotnie na obniżenie markerów peroksydacji białek (karbonyli białkowych) i lipidów (8-izoprostany) (Dzik i wsp., 2018). W niniejszym badaniu nie wykazano istotnych różnic markerów wolnorodnikowego uszkodzenia zarówno białek (grupy -SH), jak i lipidów (MDA) w grupie ZWD w porównaniu do KON i CW. Wyniki te jednoznacznie wskazują, iż suplementacja witaminą  $\text{D}_3$  częściowo chroni hipokamp przed stresem oksydacyjnym, a więc wykazuje działanie antyoksydacyjne (Rycina 15.). Badania przeprowadzone przez AlJohri i wsp. wykazały, że  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ma działanie neuroprotecyjne poprzez zwiększenie poziomu enzymatycznych przeciwutleniaczy w pierwotnej hodowli neuronów korowych. Po indukcji stresu oksydacyjnego, autorzy zaobserwowali wzrost całkowitego GSH w osadzie komórkowym przy jednoczesnym obniżeniu poziomu MDA w pożywce (AlJohri i wsp., 2019). Ponadto wykazano, że w eksperymentalnym modelu choroby Huntingtona suplementacja witaminą  $\text{D}_3$  (500 IU/ kg/ dzień) wzmocniła ekspresję BDNF i NGF obniżając jednocześnie aktywność katalazy i GPx w prądkowiu myszy (Manjari i wsp., 2022). W innej pracy wykazano, że po 4 tygodniach dootrzewnowej iniekcji z witaminą  $\text{D}_3$  w dawkach od 100-10000 IU/ kg/dzień w modelu nieprzewidywalnego przewlekłego stresu zaobserwowano neuroprotecyjne jej działanie zależnie od stosowanej dawki. Dopiero przy 1000-10000 IU/ kg/ dzień, obserwowano wzrost stężenia BDNF, obniżenie stężenia MDA, wzrost stężenia grup -SH i aktywności

dysmutazy nadtlenkowej (Bakhtiari-Dovvombaygi i wsp., 2021). Jednak wokół antyoksydacyjnej roli witaminy D istnieje wiele kontrowersji, a badania kwestionują jej działanie w tym zakresie (Tagliaferri i wsp., 2019). Rozbieżność wyników może wynikać z różnych czynników, takich jak stosowana dawka, czas trwania suplementacji i grupa badana. Dlatego różnice w wynikach badań mogą być skutkiem zmiennych metodologicznych. Konieczne są dalsze badania, aby precyzyjnie określić mechanizmy stojące za przeciwutleniającym działaniem witaminy D.

Podsumowując, obserwacje te sugerują, że suplementacja witaminą D<sub>3</sub> odgrywa istotną rolę w ochronie tkanki nerwowej przed stresem oksydacyjnym. Wyniki tej pracy wskazują, że podwyższony poziom 25(OH)D<sub>3</sub> może wywierać neuroprotektoryjny wpływ na hipokamp, mimo braku deficytów w jej metabolitach indukowanych przez długotrwałą ekspozycję na działanie GK.

## **10. Podsumowanie i wnioski**

### **10.1. Długotrwała ekspozycja na działanie DEXA**

1. 28 dniowa ekspozycja na działanie DEXA powoduje znaczne obniżenie masy hipokampa przy jednoczesnym obniżeniu GR.
2. Długotrwałe stosowanie 2mg/kg/dzień DEXA powoduje obniżenie stężenia 25(OH)D<sub>3</sub> w surowicy szczurów.
3. W wyniku suplementacji witaminą D<sub>3</sub> w hipokampie szczurów traktowanych DEXA nastąpił wzrost zawartości białek o charakterze neuroprotekcijnym wpływając na utrzymanie prawidłowej masy hipokampa.
4. Suplementacja witaminą D<sub>3</sub> wpływa korzystnie na aktywność enzymatyczną oraz zawartość specyficznych białek mitochondrialnego metabolizmu energetycznego w hipokampie szczurów po długotrwałym traktowaniu DEXA.

### **10.2. Długotrwała ekspozycja na działanie endogennych GK**

1. 28 dniowa ekspozycja na zimno powoduje istotne obniżenie masy hipokampa szczurów.
2. Długotrwała, powtarzana ekspozycja na zimno nie wpływa na stężenie 25(OH)D<sub>3</sub> i metabolitów witaminy D w surowicy zwierząt, przez co suplementacja nie wpływa na poziom VDR jak również specyficznych receptorów dla reakcji na stresor w hipokampie szczurów.
3. 28 dniowa suplementacja witaminą D<sub>3</sub> w dawce 600 IU/ kg/ dzień podczas długotrwałej ekspozycji na zimno nie wpływa na zawartość białek o charakterze ochronnym ani na masę hipokampa.
4. Suplementacja witaminą D<sub>3</sub> korzystnie wpływa na aktywność mitochondrialnego metabolizmu energetycznego i wykazuje działanie antyoksydacyjne poprzez częściowe obniżenie markerów wolnorodnikowego uszkodzenia białek i lipidów w tkance nerwowej.

## 11. Spis ilustracji

|   |    |
|---|----|
| <i>Rycina 1. Wydzielanie glikokortykosteroidów poprzez aktywność osi podwzgórzowo – przysadkowo – nadnerczowej oraz ich wewnątrzkomórkowe działanie poprzez mechanizmy genomowe i niegenomowe w hipokampie.</i> <b>Skróty:</b> ACTH, adrenokortykotropina; AVP, wazopresyna; CRH, kortykoliberyna; GR, receptor glikokortykostroidowy; GRE, element odpowiedzi na glikokortykosteroidy; MR, receptor mineralokortykosteroidowy. Opracowanie własne na podstawie Gray i wsp., 2017 oraz Sawati i wsp., 2015.....   | 16 |
| <i>Rycina 2. Szlaki biosyntezy glikokortykosteroidów (Noti i wsp., 2009).</i> .....   | 17 |
| <i>Rycina 3. Schemat szlaków sygnałowych IGF-1, proBDNF i mBDNF w metabolizmie neuronalnym. <b>Skróty:</b> IGF-1, insulinopodobny czynnik wzrostu-1; IGF-1R, receptor kinazy tyrozynowej insulinopodobnego czynnika wzrostu-1; mBDNF, forma dojrzała neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego; proBDNF, forma pro-neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego; TrkB, kinaza receptora tropomiozyny B; p75NTR, receptor neurotrofiny p75; PI3K, kinaza 3-fosfoinozytydu; ERK, kinaza białkowa regulowana pozakomórkowo; PLC<math>\gamma</math>, fosfolipaza C-gamma; Akt, kinaza serynowo-treoninowa; MAPK, kinaza białkowa aktywowana mitogenem; CaMK, kinaza białkowa zależna od wapnia; CREB, białko wiążące element odpowiedzi cAMP; JNK, kinaza białka cJUN; RhoA, kinaza związana z Rho; NF-<math>\kappa</math>B, czynnik jądrowy kappa B. Opracowanie własne na podstawie Ge i wsp., 2022; Li i wsp., 2022. ....</i> | 29 |
| <i>Rycina 4. Komórkowy metabolizm energetyczny. <b>Skróty:</b> GLUT, transporter glukozy; MCT, białko transportujące mleczan; NAD<sup>+</sup>, forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; NADH, dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy; MPC, białko transportowe translokazy pirogronianowej; PDH, kompleks dehydrogenazy pirogronianowej; CoA, acetylo-koenzym A; FADH<sub>2</sub>, dinukleotyd flawinoadeninowy; Cyt c, cytochrom c; LDH, kompleks dehydrogenazy mleczanowej. Rycina Biorender.com [przekształcona] na podstawie Rigoulet i wsp., 2020 oraz Zheng i wsp., 2016.....</i>   | 36 |
| <i>Rycina 5. Opis metabolizmu witaminy D oraz wewnątrzkomórkowy wpływ jej działania. <b>Skróty:</b> VDRB, białko wiążące witaminę D; VDR, receptor witaminy D; VDRE, element odpowiedzi witaminy D; RXR, receptor retinoidu X; MARRS, białko wiążące steroidy. ....</i>   | 41 |

|  |     |
|--|-----|
| Rycina 6. Schemat eksperymentu w czasie.....   | 96  |
| Rycina 7. Schemat ekspozycji zwierząt na zimno/ciepło w szklanych zbiornikach. ....  | 96  |
| Rycina 8. Masa hipokampa (a) oraz stosunek masy hipokampa do masy ciała (b) w poszczególnych grupach: u szczurów z grupy pozornego stresu zimna (CW), grupy traktowanej stresorem w postaci zimna (ZW) oraz dodatkowo suplementowanej witaminą D <sub>3</sub> (ZWD). Wyniki zostały wyrażone jako średnia ± SEM; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01. ....                                       | 107 |
| Rycina 9. Poziomy receptora VDR (a) i GR (b) w hipokampie szczurów. <b>Skróty:</b> KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowana witaminą D <sub>3</sub> . Wyniki zostały wyrażone, jako średnia ± SEM.....  | 108 |
| Rycina 10. Poziomy IGF-1 (a), Akt (b), pAkt (c) oraz stosunek poziomów pAkt/Akt (d) w hipokampie szczurów. <b>Skróty:</b> KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowana witaminą D <sub>3</sub> . Wyniki zostały wyrażone, jako średnia ± SEM; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01. .... | 109 |
| Rycina 11. Poziomy mBDNF (a), proBDNF (b) oraz stosunek poziomów proBDNF/mBDNF (c) w hipokampie szczurów. <b>Skróty:</b> CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowana witaminą D <sub>3</sub> . Wyniki zostały wyrażone, jako średnia ± SEM; *p ≤ 0,05.....                                      | 110 |
| Rycina 12. Poziomy RBM3 (a) oraz NFL (b) w hipokampie szczurów. <b>Skróty:</b> KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowana witaminą D <sub>3</sub> . Wyniki zostały wyrażone, jako średnia ± SEM; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01.....   | 111 |
| Rycina 13. Poziomy COX IV (a), COX II (b) oraz PGC-1α w hipokampie szczurów. <b>Skróty:</b> KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowana witaminą D <sub>3</sub> . Wyniki zostały wyrażone, jako średnia ± SEM; *p ≤ 0,05.....  | 112 |

Rycina 14. Aktywności syntazy cytrynianowej (CS) w hipokampie szczurów. **Skróty:** KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego stresu zimna, ZW – grupa traktowana stresorem zimna, ZWD – grupa traktowanej stresem zimna i suplementowana witaminą D<sub>3</sub>. Wyniki zostały wyrażone, jako średnia ± SEM. ....113

Rycina 15. Rycina 15. Stężenie 8-izoprostanów (a), MDA (b), grup -SH (c) w hipokampie szczurów. **Skróty:** KON – grupa kontrolna, CW – grupa pozornego zanurzenia w zimnej wodzie, ZW – grupa traktowana stresorem zimna, ZWD – grupa zanurzona w zimnej wodzie i suplementowana witaminą D<sub>3</sub>, MDA – aldehyd dimalonowy, grupy -SH – grupy sulfhydrylowe. Wyniki zostały wyrażone jako średnia ± SEM; \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01. 114

## 12. Spis tabeli

|  |     |
|--|-----|
| <i>Tabela 1. Porównanie syntetycznych glikokortykosteroidów po podaniu doustnym (Baid i Nieman, 2006).</i> .....   | 25  |
| <i>Tabela 2. Progi diagnostyczne witaminy D oraz rekomendacje suplementacji witaminy D<sub>3</sub> w Polsce od 2018 roku (Płudowski i wsp., 2023).</i> ..... | 43  |
| <i>Tabela 3. Bufory i odczynniki wykorzystane do oznaczeń kinetycznych.</i> .....  | 100 |
| <i>Tabela 4. Pierwszo- i drugorzędowe przeciwciała oraz warunki do oznaczenia poszczególnych białek zastosowane w pracy.</i> .....                           | 103 |
| <i>Tabela 5. Bufory i materiały wykorzystane w pracy do oznaczeń poziomu wybranych białek metodą Western Blot.</i> .....                                     | 104 |

### 13. Bibliografia

- Abbah, J., Vacher, C.-M., Goldstein, E. Z., Li, Z., Kundu, S., Talbot, B., Bhattacharya, S., Hashimoto-Torii, K., Wang, L., Banerjee, P., Scafidi, J., Smith, N. A., Chew, L.-J., & Gallo, V. (2022). Oxidative Stress-Induced Damage to the Developing Hippocampus Is Mediated by GSK3 $\beta$ . *The Journal of Neuroscience*, 42(24), 4812–4827. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2389-21.2022>
- Abdollahzadeh, M., Panahpour, H., Ghaheri, S., & Saadati, H. (2022). Calcitriol supplementation attenuates cisplatin-induced behavioral and cognitive impairments through up-regulation of BDNF in male rats. *Brain Res Bull*, 181, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.01.006>
- Aghanoori, M.-R., Agarwal, P., Gauvin, E., Nagalingam, R. S., Bonomo, R., Yathindranath, V., Smith, D. R., Hai, Y., Lee, S., Jolival, C. G., Calcutt, N. A., Jones, M. J., Czubryt, M. P., Miller, D. W., Dolinsky, V. W., Mansuy-Aubert, V., & Fernyhough, P. (2022). CEBP $\beta$  regulation of endogenous IGF-1 in adult sensory neurons can be mobilized to overcome diabetes-induced deficits in bioenergetics and axonal outgrowth. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(4), 193. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04201-9>
- Ahmad, I., Yue, W. Y., Fernando, A., Clark, J. J., Woodson, E. A., & Hansen, M. R. (2014). p75NTR is highly expressed in vestibular schwannomas and promotes cell survival by activating nuclear transcription factor  $\kappa$ B. *Glia*, 62(10), 1699–1712. <https://doi.org/10.1002/glia.22709>
- Ahuja, P., Ng, C. F., Pang, B. P. S., Chan, W. S., Tse, M. C. L., Bi, X., Kwan, H.-L. R., Brobst, D., Herlea-Pana, O., Yang, X., Du, G., Saengnipanthkul, S., Noh, H. L., Jiao, B., Kim, J. K., Lee, C. W., Ye, K., & Chan, C. B. (2022). Muscle-generated BDNF (brain derived neurotrophic factor) maintains mitochondrial quality control in female mice. *Autophagy*, 18(6), 1367–1384. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1985257>
- Al-Amin, M., Bradford, D., Sullivan, R. K. P., Kurniawan, N. D., Moon, Y., Han, S., Zalesky, A., & Burne, T. H. J. (2019). Vitamin D deficiency is associated with reduced hippocampal volume and disrupted structural connectivity in patients with mild cognitive impairment. *Human Brain Mapping*, 40(2), 394–406. <https://doi.org/10.1002/hbm.24380>



- Ali, A., Vasileva, S., Langguth, M., Alexander, S., Cui, X., Whitehouse, A., McGrath, J. J., & Eyles, D. (2019). Developmental Vitamin D Deficiency Produces Behavioral Phenotypes of Relevance to Autism in an Animal Model. *Nutrients*, *11*(5), 1187. <https://doi.org/10.3390/nu11051187>
- AlJohri, R., AlOkail, M., & Haq, S. H. (2019). Neuroprotective role of vitamin D in primary neuronal cortical culture. *eNeurologicalSci*, *14*, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.ensci.2018.12.004>
- Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2013). Brain Energy Metabolism. W *Fundamental Neuroscience*, 4 Wyd. Elsevier. 261–284. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385870-2.00012-3>
- Allen, S. J., Watson, J. J., Shoemark, D. K., Barua, N. U., & Patel, N. K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacology & Therapeutics*, *138*(2), 155–175. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.004>
- Amadio, P., Sandrini, L., Ieraci, A., Tremoli, E., & Barbieri, S. (2017). Effect of Clotting Duration and Temperature on BDNF Measurement in Human Serum. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9), 1987. <https://doi.org/10.3390/ijms18091987>
- Anders, Q. S., Ferreira, L. V. B., Rodrigues, L. C. de M., & Nakamura-Palacios, E. M. (2020). BDNF mRNA Expression in Leukocytes and Frontal Cortex Function in Drug Use Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00469>
- Aparecida Nedel Pertile, R., Kiltshewskij, D., Geaghan, M., Barnett, M., Cui, X., Cairns, M. J., & Eyles, D. (2022). Developmental vitamin D-deficiency increases the expression of microRNAs involved in dopamine neuron development. *Brain Research*, *1789*, 147953. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.147953>
- Ashton, N. J., Leuzy, A., Lim, Y. M., Troakes, C., Hortobágyi, T., Höglund, K., Aarsland, D., Lovestone, S., Schöll, M., Blennow, K., Zetterberg, H., & Hye, A. (2019). Increased plasma neurofilament light chain concentration correlates with severity of post-mortem neurofibrillary tangle pathology and neurodegeneration. *Acta Neuropathologica Communications*, *7*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0649-3>
- Asif A, & Farooq N. (2023, styczeń). *Vitamin D Toxicity*. StatPearls [Internet].

- Atrooz, F., Alkadhi, K. A., & Salim, S. (2021). Understanding stress: Insights from rodent models. *Current Research in Neurobiology*, 2, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.crneur.2021.100013>
- Azarfarin, M., Farajdokht, F., Babri, S., Salehpour, F., Taghizadeh, M., & Mohaddes, G. (2018). Effects of troxerutin on anxiety- and depressive-like behaviors induced by chronic mild stress in adult male rats. *Iranian journal of basic medical sciences*, 21(8), 781–786. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.26915.6582>
- Azman, K. F., & Zakaria, R. (2022). Recent Advances on the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6827. <https://doi.org/10.3390/ijms23126827>
- Baid, S., & Nieman, L. (2006). Therapeutic doses of glucocorticoids: implications for oral medicine. *Oral Diseases*, 12(5), 436–442. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01290.x>
- Bakhtiari-Dovvombaygi, H., Izadi, S., Zare, M., Asgari Hassanlouei, E., Dinpanah, H., Ahmadi-Soleimani, S. M., & Beheshti, F. (2021). Vitamin D3 administration prevents memory deficit and alteration of biochemical parameters induced by unpredictable chronic mild stress in rats. *Scientific Reports*, 11(1), 16271. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95850-6>
- Baptista, P., & Andrade, J. P. (2018). Adult Hippocampal Neurogenesis: Regulation and Possible Functional and Clinical Correlates. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00044>
- Barro, C., Benkert, P., Disanto, G., Tsagkas, C., Amann, M., Naegelin, Y., Leppert, D., Gobbi, C., Granziera, C., Yaldizli, Ö., Michalak, Z., Wuerfel, J., Kappos, L., Parmar, K., & Kuhle, J. (2018). Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain*, 141(8), 2382–2391. <https://doi.org/10.1093/brain/awy154>
- Bashan, N., Kovsan, J., Kachko, I., Ovadia, H., & Rudich, A. (2009). Positive and Negative Regulation of Insulin Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Physiological Reviews*, 89(1), 27–71. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2008>

- Bastide, A., Peretti, D., Knight, J. R. P., Grosso, S., Spriggs, R. V., Pichon, X., Sbarrato, T., Roobol, A., Roobol, J., Vito, D., Bushell, M., von der Haar, T., Smales, C. M., Mallucci, G. R., & Willis, A. E. (2017). RTN3 Is a Novel Cold-Induced Protein and Mediates Neuroprotective Effects of RBM3. *Current Biology*, 27(5), 638–650. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.047>
- Bayat, M., Kohlmeier, K. A., Haghani, M., Haghghi, A. B., Khalili, A., Bayat, G., Hooshmandi, E., & Shabani, M. (2021). Co-treatment of vitamin D supplementation with enriched environment improves synaptic plasticity and spatial learning and memory in aged rats. *Psychopharmacology*, 238(8), 2297–2312. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05853-4>
- Bhatt, S., Nagappa, A. N., & Patil, C. R. (2020). Role of oxidative stress in depression. *Drug Discovery Today*, 25(7), 1270–1276. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.05.001>
- Bhattacharai, P., Bhattacharai, J. P., Kim, M. S., & Han, S. K. (2017). Non-genomic action of vitamin D3 on N-methyl-D-aspartate and kainate receptor-mediated actions in juvenile gonadotrophin-releasing hormone neurons. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(6), 1231. <https://doi.org/10.1071/RD15357>
- Bianchi, V., Locatelli, V., & Rizzi, L. (2017). Neurotrophic and Neuroregenerative Effects of GH/IGF1. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2441. <https://doi.org/10.3390/ijms18112441>
- Bikle, D. D. (2000). *Vitamin D: Production, Metabolism and Mechanisms of Action*. . In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. PMID: 25905172.
- Bondy, C. A., Bach, M. A., & Lee, W.-H. (1992). Mapping of brain insulin and insulin-like growth factor receptor gene expression by in situ hybridization. *Neuroprotocols*, 1(3), 240–249. [https://doi.org/10.1016/1058-6741\(92\)90034-U](https://doi.org/10.1016/1058-6741(92)90034-U)

- Botelho, J., Machado, V., Proença, L., Delgado, A. S., & Mendes, J. J. (2020). Vitamin D Deficiency and Oral Health: A Comprehensive Review. *Nutrients*, *12*(5), 1471. <https://doi.org/10.3390/nu12051471>
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *3*(4), 228–237. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Bouzier, A., Thiaudiere, E., Biran, M., Rouland, R., Canioni, P., & Merle, M. (2000). The Metabolism of [3- <sup>13</sup> C]Lactate in the Rat Brain Is Specific of a Pyruvate Carboxylase-Deprived Compartment. *Journal of Neurochemistry*, *75*(2), 480–486. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750480.x>
- Buttgereit, F. (2002). Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: current questions and tentative answers in rheumatology. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *61*(8), 718–722. <https://doi.org/10.1136/ard.61.8.718>
- Camandola, S., & Mattson, M. P. (2017). Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *The EMBO Journal*, *36*(11), 1474–1492. <https://doi.org/10.15252/embj.201695810>
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, *84*(1), 277–359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
- Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Landum, R. W., Cheng, M. S., Wu, J. F., & Floyd, R. A. (1991). Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(9), 3633–3636. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3633>
- Cashman, K. D., Dowling, K. G., Škrabáková, Z., Gonzalez-Gross, M., Valtueña, J., De Henauw, S., Moreno, L., Damsgaard, C. T., Michaelsen, K. F., Mølgaard, C., Jorde, R.,

- Grimnes, G., Moschonis, G., Mavrogianni, C., Manios, Y., Thamm, M., Mensink, G. B., Rabenberg, M., Busch, M. A., ... Kiely, M. (2016). Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *The American Journal of Clinical Nutrition*, *103*(4), 1033–1044. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.120873>
- Castellani, J. W., & Young, A. J. (2016). Human physiological responses to cold exposure: Acute responses and acclimatization to prolonged exposure. *Autonomic Neuroscience*, *196*, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.02.009>
- Cereseto, M., Reinés, A., Ferrero, A., Sifonios, L., Rubio, M., & Wikinski, S. (2006). Chronic treatment with high doses of corticosterone decreases cytoskeletal proteins in the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *24*(12), 3354–3364. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05232.x>
- Chan, D. C. (2020). Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *15*(1), 235–259. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032711>
- Charoenngam, N., & Holick, M. F. (2020). Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients*, *12*(7), 2097. <https://doi.org/10.3390/nu12072097>
- Chattopadhyay, S., & Shubayev, V. I. (2009). MMP-9 controls Schwann cell proliferation and phenotypic remodeling via IGF-1 and ErbB receptor-mediated activation of MEK/ERK pathway. *Glia*, *57*(12), 1316–1325. <https://doi.org/10.1002/glia.20851>
- Checinska-Maciejewska, Z., Niepolski, L., Checinska, A., Korek, E., Kolodziejczak, B., Kopczyński, Z., Krauss, H., Pruszyńska-Oszmalek, E., Kolodziejcki, P., & Gibas-Dorna, M. (2019). Regular cold water swimming during winter time affects resting hematological parameters and serum erythropoietin. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, *70*(5). <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.5.10>
- Chen, J., Gomez-Sanchez, C. E., Penman, A., May, P. J., & Gomez-Sanchez, E. (2014). Expression of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in preautonomic neurons of the rat paraventricular nucleus. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative*

*and Comparative Physiology*, 306(5), R328–R340.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00506.2013>

Cheng, A., Wan, R., Yang, J.-L., Kamimura, N., Son, T. G., Ouyang, X., Luo, Y., Okun, E., & Mattson, M. P. (2012). Involvement of PGC-1 $\alpha$  in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nature Communications*, 3(1), 1250.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms2238>

Cheng, X.-T., Huang, N., & Sheng, Z.-H. (2022). Programming axonal mitochondrial maintenance and bioenergetics in neurodegeneration and regeneration. *Neuron*, 110(12), 1899–1923. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.03.015>

Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M. C., Wakabayashi, C., & Kunugi, H. (2012). Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(1), 112–119.  
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.05.018>

Chip, S., Zelmer, A., Ogunshola, O. O., Felderhoff-Mueser, U., Nitsch, C., Bühner, C., & Wellmann, S. (2011). The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection. *Neurobiology of Disease*, 43(2), 388–396.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.04.010>

Choi, G. E., & Han, H. J. (2021). Glucocorticoid impairs mitochondrial quality control in neurons. *Neurobiology of Disease*, 152, 105301.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105301>

Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>

Chu, B., Marwaha, K., Sanvictores, T., & Ayers, D. (2023). *Physiology, Stress Reaction*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541120/>

Clark DD i Sokoloff, L. (1999). Circulation and Energy Metabolism of the Brain in Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K., and Uhler M.D. *Basic Neurochemistry*: 134

Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th Edition. Lippincott-Raven, New York, 637-669

- Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., & Varon, S. (1997). Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein and mRNA in the Normal Adult Rat CNS: Evidence for Anterograde Axonal Transport. *The Journal of Neuroscience*, *17*(7), 2295–2313. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-07-02295.1997>
- Coppens, S., Lehmann, S., Hopley, C., & Hirtz, C. (2023). Neurofilament-Light, a Promising Biomarker: Analytical, Metrological and Clinical Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(14), 11624. <https://doi.org/10.3390/ijms241411624>
- Cui, X., Gooch, H., Petty, A., McGrath, J. J., & Eyles, D. (2017). Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *453*, 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.05.035>
- Danno, S., Itoh, K., Matsuda, T., & Fujita, J. (2000). Decreased Expression of Mouse Rbm3, a Cold-Shock Protein, in Sertoli Cells of Cryptorchid Testis. *The American Journal of Pathology*, *156*(5), 1685–1692. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65039-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65039-0)
- de Almeida, A. J. P. O., de Oliveira, J. C. P. L., da Silva Pontes, L. V., de Souza Júnior, J. F., Gonçalves, T. A. F., Dantas, S. H., de Almeida Feitosa, M. S., Silva, A. O., & de Medeiros, I. A. (2022). ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2022*, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2022/1225578>
- de Kloet, C. S., Vermetten, E., Geuze, E., Wiegant, V. M., & Westenberg, H. G. M. (2008). Elevated plasma arginine vasopressin levels in veterans with posttraumatic stress disorder. *Journal of Psychiatric Research*, *42*(3), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.11.009>
- de Kloet, E. R. (2022). Brain mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in neuroendocrine regulation and stress-related psychiatric etiopathologies. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, *24*, 100352. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2022.100352>

- de Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(6), 463–475. <https://doi.org/10.1038/nrn1683>
- Desquiret, V., Gueguen, N., Malthièry, Y., Ritz, P., & Simard, G. (2008). Mitochondrial effects of dexamethasone imply both membrane and cytosolic-initiated pathways in HepG2 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *40*(8), 1629–1641. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.12.010>
- Deyama, S., & Kaneda, K. (2020). The duration of the antidepressant-like effects of a single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the medial prefrontal cortex in mice. *Behavioural Brain Research*, *394*, 112844. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112844>
- Dhabhar, F. S. (2014). Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunologic Research*, *58*(2–3), 193–210. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8517-0>
- Dhabhar, F. S. (2018). The short-term stress response – Mother nature’s mechanism for enhancing protection and performance under conditions of threat, challenge, and opportunity. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *49*, 175–192. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.03.004>
- Dhabhar, F. S., & McEwen, B. S. (1997). Acute Stress Enhances while Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity in Vivo: A Potential Role for Leukocyte Trafficking. *Brain, Behavior, and Immunity*, *11*(4), 286–306. <https://doi.org/10.1006/brbi.1997.0508>
- Dickinson, B. C., Peltier, J., Stone, D., Schaffer, D. V., & Chang, C. J. (2011). Nox2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain. *Nature Chemical Biology*, *7*(2), 106–112. <https://doi.org/10.1038/nchembio.497>
- Dominguez, L. J., Farruggia, M., Veronese, N., & Barbagallo, M. (2021). Vitamin D Sources, Metabolism, and Deficiency: Available Compounds and Guidelines for Its Treatment. *Metabolites*, *11*(4), 255. <https://doi.org/10.3390/metabo11040255>
- dos Santos, N., Novaes, L. S., Dragunas, G., Rodrigues, J. R., Brandão, W., Camarini, R., Peron, J. P. S., & Munhoz, C. D. (2019). High dose of dexamethasone protects against EAE-induced motor deficits but impairs learning/memory in C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, *9*(1), 6673. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43217-3>



- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., McEwen, B. S., & Manji, H. K. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(9), 3543–3548. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812671106>
- Dubashynskaya, N. V., Bokaty, A. N., & Skorik, Y. A. (2021). Dexamethasone Conjugates: Synthetic Approaches and Medical Prospects. *Biomedicines*, *9*(4), 341. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040341>
- Dyall, S. D., Brown, M. T., & Johnson, P. J. (2004). Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles. *Science*, *304*(5668), 253–257. <https://doi.org/10.1126/science.1094884>
- Dyer, A. H., Vahdatpour, C., Sanfeliu, A., & Tropea, D. (2016). The role of Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) in brain development, maturation and neuroplasticity. *Neuroscience*, *325*, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.056>
- Dzik, K. P., & Kaczor, J. J. (2019). Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. *European Journal of Applied Physiology*, *119*(4), 825–839. <https://doi.org/10.1007/s00421-019-04104-x>
- Dzik, K. P., Skrobot, W., Kaczor, K. B., Flis, D. J., Karnia, M. J., Libionka, W., Antosiewicz, J., Kloc, W., & Kaczor, J. J. (2019). Vitamin D Deficiency Is Associated with Muscle Atrophy and Reduced Mitochondrial Function in Patients with Chronic Low Back Pain. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/6835341>
- Dzik, K., Skrobot, W., Flis, D. J., Karnia, M., Libionka, W., Kloc, W., & Kaczor, J. J. (2018). Vitamin D supplementation attenuates oxidative stress in paraspinal skeletal muscles in patients with low back pain. *European Journal of Applied Physiology*, *118*(1), 143–151. <https://doi.org/10.1007/s00421-017-3755-1>
- Eckhard, L., Jones, T., Collins, J. E., Shrestha, S., & Fitz, W. (2019). Increased postoperative dexamethasone and gabapentin reduces opioid consumption after total knee arthroplasty. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, *27*(7), 2167–2172. <https://doi.org/10.1007/s00167-019-05449-8>

- Eichenbaum, H. (2001). The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behavioural Brain Research*, *127*(1–2), 199–207. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00365-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00365-5)
- Eiland, L., Ramroop, J., Hill, M. N., Manley, J., & McEwen, B. S. (2012). Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(1), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.04.015>
- El Marzouki, H., Aboussaleh, Y., Najimi, M., Chigr, F., & Ahami, A. (2021). Effect of Cold Stress on Neurobehavioral and Physiological Parameters in Rats. *Frontiers in Physiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.660124>
- Espeland, D., de Weerd, L., & Mercer, J. B. (2022). Health effects of voluntary exposure to cold water – a continuing subject of debate. *International Journal of Circumpolar Health*, *81*(1). <https://doi.org/10.1080/22423982.2022.2111789>
- Eyles, D., Brown, J., Mackay-Sim, A., McGrath, J., & Feron, F. (2003). Vitamin d3 and brain development. *Neuroscience*, *118*(3), 641–653. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00040-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00040-X)
- Eyles, D. W. (2021). Vitamin D: Brain and Behavior. *JBMR Plus*, *5*(1). <https://doi.org/10.1002/jbm4.10419>
- Eyles, D. W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M., & McGrath, J. J. (2005). Distribution of the Vitamin D receptor and 1 $\alpha$ -hydroxylase in human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *29*(1), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.08.006>
- Feng, J. H., Sim, S. M., Park, J. S., Hong, J. S., & Suh, H. (2021). Modulation of corticosterone and changes of signal molecules in the HPA axis after cold water swimming stress. *Animal Cells and Systems*, *25*(1), 37–45. <https://doi.org/10.1080/19768354.2021.1890211>
- Flohé, L. (2020). Looking Back at the Early Stages of Redox Biology. *Antioxidants*, *9*(12), 1254. <https://doi.org/10.3390/antiox9121254>

- Fogwe LA, Reddy V, & Mesfin FB. (2023). *Neuroanatomy, Hippocampus*. W: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 29489273.
- Forman, H. J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
- Forsberg, K., Wuttke, A., Quadrato, G., Chumakov, P. M., Wizenmann, A., & Di Giovanni, S. (2013). The Tumor Suppressor p53 Fine-Tunes Reactive Oxygen Species Levels and Neurogenesis via PI3 Kinase Signaling. *The Journal of Neuroscience*, 33(36), 14318–14330. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1056-13.2013>
- Fraser, D. R. (2021). Vitamin D toxicity related to its physiological and unphysiological supply. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 32(11), 929–940. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.08.006>
- Frigerio, I., Laansma, M. A., Lin, C.-P., Hermans, E. J. M., Bouwman, M. M. A., Bol, J. G. J. M., Galis-de Graaf, Y., Hepp, D. H., Rozemuller, A. J. M., Barkhof, F., van de Berg, W. D. J., & Jonkman, L. E. (2023). Neurofilament light chain is increased in the parahippocampal cortex and associates with pathological hallmarks in Parkinson's disease dementia. *Translational Neurodegeneration*, 12(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00328-8>
- Fujii, R., Watanabe, K., Okamoto, N., Natsuyama, T., Tesen, H., Igata, R., Konishi, Y., Ikenouchi, A., Kakeda, S., & Yoshimura, R. (2022). Hippocampal Volume and Plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Patients With Depression and Healthy Controls. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.857293>
- Fukui, K., Onodera, K., Shinkai, T., Suzuki, S., & Urano, S. (2001). Impairment of Learning and Memory in Rats Caused by Oxidative Stress and Aging, and Changes in Antioxidative Defense Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928(1), 168–175. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb05646.x>

- Gaetani, L., Blennow, K., Calabresi, P., Di Filippo, M., Parnetti, L., & Zetterberg, H. (2019). Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *90*(8), 870–881. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-320106>
- Gáll, Z., & Székely, O. (2021). Role of Vitamin D in Cognitive Dysfunction: New Molecular Concepts and Discrepancies between Animal and Human Findings. *Nutrients*, *13*(11), 3672. <https://doi.org/10.3390/nu13113672>
- Gallo, L. I., Ghini, A. A., Piwien Pilipuk, G., & Galigniana, M. D. (2007). Differential Recruitment of Tetratricopeptide Repeat Domain Immunophilins to the Mineralocorticoid Receptor Influences both Heat-Shock Protein 90-Dependent Retrotransport and Hormone-Dependent Transcriptional Activity. *Biochemistry*, *46*(49), 14044–14057. <https://doi.org/10.1021/bi701372c>
- García-Bueno, B., Caso, J. R., & Leza, J. C. (2008). Stress as a neuroinflammatory condition in brain: Damaging and protective mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *32*(6), 1136–1151. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.04.001>
- Ge, L., Liu, S., Rubin, L., Lazarovici, P., & Zheng, W. (2022). Research Progress on Neuroprotection of Insulin-like Growth Factor-1 towards Glutamate-Induced Neurotoxicity. *Cells*, *11*(4), 666. <https://doi.org/10.3390/cells11040666>
- Gray, J. D., Kogan, J. F., Marrocco, J., & McEwen, B. S. (2017). Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nature Reviews Endocrinology*, *13*(11), 661–673. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.97>
- Gundle, L., & Atkinson, A. (2020). Pregnancy, cold water swimming and cortisol: The effect of cold water swimming on obstetric outcomes. *Medical Hypotheses*, *144*, 109977. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109977>
- Guo, C., Ding, P., Xie, C., Ye, C., Ye, M., Pan, C., Cao, X., Zhang, S., & Zheng, S. (2017). Potential application of the oxidative nucleic acid damage biomarkers in detection of diseases. *Oncotarget*, *8*(43), 75767–75777. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20801>
- Hallak, H., Ramadan, B., & Rubin, R. (2001). Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by oxidant stress in cerebellar granule neurons: modulation by N -

- methyl- d -aspartate through calcineurin activity. *Journal of Neurochemistry*, 77(1), 63–70. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00208.x>
- Halling, J. F., & Pilegaard, H. (2020). PGC-1 $\alpha$ -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 45(9), 927–936. <https://doi.org/10.1139/apnm-2020-0005>
- Halliwell, B. (1992). Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*, 59(5), 1609–1623. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x>
- Halliwell B., G. J. M. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press. 1-936.
- Hankenson, F. C., Marx, J. O., Gordon, C. J., & David, J. M. (2018). Effects of Rodent Thermoregulation on Animal Models in the Research Environment. *Comparative Medicine*, 68(6), 425–438. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-18-000049>
- Hardy, R. S., Raza, K., & Cooper, M. S. (2020). Therapeutic glucocorticoids: mechanisms of actions in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 16(3), 133–144. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0371-y>
- Harris, J. J., Jolivet, R., & Attwell, D. (2012). Synaptic Energy Use and Supply. *Neuron*, 75(5), 762–777. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.019>
- Härtig, W., Krueger, M., Hofmann, S., Preißler, H., Märkel, M., Frydrychowicz, C., Mueller, W. C., Bechmann, I., & Michalski, D. (2016). Up-regulation of neurofilament light chains is associated with diminished immunoreactivities for MAP2 and tau after ischemic stroke in rodents and in a human case. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 78, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.09.004>
- Hayakawa, N., Fukumura, J., Yasuno, H., Fujimoto-Ouchi, K., & Kitamura, H. (2015). 1 $\alpha$ ,25(OH)2D3 downregulates gene expression levels of muscle ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in human myotubes. *Biomedical Research*, 36(2), 71–80. <https://doi.org/10.2220/biomedres.36.71>
- Hii, C., & Ferrante, A. (2016). The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*, 8(3), 135. <https://doi.org/10.3390/nu8030135>

- Hitti, F. L., & Siegelbaum, S. A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*, *508*(7494), 88–92. <https://doi.org/10.1038/nature13028>
- Holick, M. F. (2017). The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *18*(2), 153–165. <https://doi.org/10.1007/s11154-017-9424-1>
- Hu, Y., Liu, Y., & Li, S. (2022). Effect of Acute Cold Stress on Neuroethology in Mice and Establishment of Its Model. *Animals*, *12*(19), 2671. <https://doi.org/10.3390/ani12192671>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annual Review of Neuroscience*, *24*(1), 677–736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Hyder, F., Rothman, D. L., & Bennett, M. R. (2013). Cortical energy demands of signaling and nonsignaling components in brain are conserved across mammalian species and activity levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(9), 3549–3554. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214912110>
- Hyman, C., Juhasz, M., Jackson, C., Wright, P., Ip, N., & Lindsay, R. (1994). Overlapping and distinct actions of the neurotrophins BDNF, NT-3, and NT-4/5 on cultured dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalon. *The Journal of Neuroscience*, *14*(1), 335–347. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-01-00335.1994>
- Ito, F., Sono, Y., & Ito, T. (2019). Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants*, *8*(3), 72. <https://doi.org/10.3390/antiox8030072>
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M. J., Kaufman, E., & Sokoloff, L. (2003). Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(8), 4879–4884. <https://doi.org/10.1073/pnas.0831078100>
- Jacobs, R. A., Díaz, V., Meinild, A., Gassmann, M., & Lundby, C. (2013). The C57Bl/6 mouse serves as a suitable model of human skeletal muscle mitochondrial function.

*Experimental Physiology*, 98(4), 908–921.  
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.070037>

Janssen, J. A. M. J. L. (2022). New Insights into the Role of Insulin and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis in the Metabolic Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8178. <https://doi.org/10.3390/ijms23158178>

Je, H. S., Yang, F., Ji, Y., Nagappan, G., Hempstead, B. L., & Lu, B. (2012). Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), 15924–15929. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207767109>

Jiang, P., Xue, Y., Li, H.-D., Liu, Y.-P., Cai, H.-L., Tang, M.-M., & Zhang, L.-H. (2014). Dysregulation of vitamin D metabolism in the brain and myocardium of rats following prolonged exposure to dexamethasone. *Psychopharmacology*, 231(17), 3445–3451. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3440-6>

Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 459–466. <https://doi.org/10.1038/nrn2632>

Jögi, A., Brennan, D. J., Rydén, L., Magnusson, K., Fernö, M., Stål, O., Borgquist, S., Uhlen, M., Landberg, G., Pählman, S., Pontén, F., & Jirström, K. (2009). Nuclear expression of the RNA-binding protein RBM3 is associated with an improved clinical outcome in breast cancer. *Modern Pathology*, 22(12), 1564–1574. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.124>

Johnson, D. B., Lopez, M. J., & Kelley, B. (2023). *Dexamethasone*.W StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482130/>

Johnson DB, Lopez MJ, K. B. (2023). *Dexamethasone*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482130/>

Jones, D. M., Bailey, S. P., De Pauw, K., Folger, S., Roelands, B., Buono, M. J., & Meeusen, R. (2019). Evaluation of cognitive performance and neurophysiological function during

repeated immersion in cold water. *Brain Research*, 1718, 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.04.032>

Jones, K. A., Zouikr, I., Patience, M., Clarkson, A. N., Isgaard, J., Johnson, S. J., Spratt, N., Nilsson, M., & Walker, F. R. (2015). Chronic stress exacerbates neuronal loss associated with secondary neurodegeneration and suppresses microglial-like cells following focal motor cortex ischemia in the mouse. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 57–67.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.02.014>

Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>

Jurkowski, M. P., Bettio, L., K. Woo, E., Patten, A., Yau, S.-Y., & Gil-Mohapel, J. (2020). Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.576444>

Kaczor, J. J., Robertshaw, H. A., & Tarnopolsky, M. A. (2017). Higher oxidative stress in skeletal muscle of McArdle disease patients. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 12, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2017.05.009>

Karnia, M. J., Korewo, D., Myślińska, D., Ciepiewski, Z. M., Puchalska, M., Konieczna-Wolska, K., Kowalski, K., & Kaczor, J. J. (2021). The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients*, 13(3), 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936>

Karnia, M. J., Myslinska, D., Dzik, K. P., Flis, D. J., Ciepiewski, Z. M., Podlacha, M., & Kaczor, J. J. (2018). The Electrical Stimulation of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Causes Oxidative Stress in Skeletal Muscle of Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/4671213>

Karnia, M. J., Myślińska, D., Dzik, K. P., Flis, D. J., Podlacha, M., & Kaczor, J. J. (2020). BST Stimulation Induces Atrophy and Changes in Aerobic Energy Metabolism in Rat Skeletal Muscles—The Biphasic Action of Endogenous Glucocorticoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2787. <https://doi.org/10.3390/ijms21082787>



- Karst, H., Berger, S., Turiault, M., Tronche, F., Schütz, G., & Joëls, M. (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(52), 19204–19207. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507572102>
- Kehm, R., Baldensperger, T., Raupbach, J., & Höhn, A. (2021). Protein oxidation - Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biology*, *42*, 101901. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101901>
- Khalil, M., Teunissen, C. E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M. P., Gattringer, T., Barro, C., Kappos, L., Comabella, M., Fazekas, F., Petzold, A., Blennow, K., Zetterberg, H., & Kuhle, J. (2018). Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, *14*(10), 577–589. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z>
- Kilgour, A. H. M., Semple, S., Marshall, I., Andrews, P., Andrew, R., & Walker, B. R. (2015). 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in the Brain Does Not Contribute to Systemic Interconversion of Cortisol and Cortisone in Healthy Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *100*(2), 483–489. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3277>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, *25*(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Koehl, M., & Abrous, D. N. (2011). A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, *33*(6), 1101–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07609.x>
- Kokkinopoulou, I., Diakoumi, A., & Moutsatsou, P. (2021). Glucocorticoid Receptor Signaling in Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(20), 11173. <https://doi.org/10.3390/ijms222011173>
- Kong, Q., Shan, X., Chang, Y., Tashiro, H., & Lin, C.-L. G. (2008). RNA oxidation: A contributing factor or an epiphenomenon in the process of neurodegeneration. *Free Radical Research*, *42*(9), 773–777. <https://doi.org/10.1080/10715760802311187>

- Kongsbak, M., Levring, T. B., Geisler, C., & von Essen, M. R. (2013). The Vitamin D Receptor and T Cell Function. *Frontiers in Immunology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00148>
- Koning, A.-S. C. A. M., Buurstede, J. C., van Weert, L. T. C. M., & Meijer, O. C. (2019). Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors in the Brain: A Transcriptional Perspective. *Journal of the Endocrine Society*, 3(10), 1917–1930. <https://doi.org/10.1210/js.2019-00158>
- Krisko, A., & Radman, M. (2019). Protein damage, ageing and age-related diseases. *Open Biology*, 9(3). <https://doi.org/10.1098/rsob.180249>
- Lang, L., Xu, B., Yuan, J., Li, S., Lian, S., Chen, Y., Guo, J., & Yang, H. (2020). GABA-mediated activated microglia induce neuroinflammation in the hippocampus of mice following cold exposure through the NLRP3 inflammasome and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *International Immunopharmacology*, 89, 106908. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106908>
- Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C. N., Nielsen, L. B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H. D., Boushel, R., Helge, J. W., Dela, F., & Hey-Mogensen, M. (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *The Journal of Physiology*, 590(14), 3349–3360. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230185>
- Lasoń, W., Jantas, D., Leśkiewicz, M., Regulska, M., & Basta-Kaim, A. (2023). The Vitamin D Receptor as a Potential Target for the Treatment of Age-Related Neurodegenerative Diseases Such as Alzheimer's and Parkinson's Diseases: A Narrative Review. *Cells*, 12(4), 660. <https://doi.org/10.3390/cells12040660>
- Lee, D.-H., Geyer, E., Flach, A.-C., Jung, K., Gold, R., Flügel, A., Linker, R. A., & Lühder, F. (2012). Central nervous system rather than immune cell-derived BDNF mediates axonal protective effects early in autoimmune demyelination. *Acta Neuropathologica*, 123(2), 247–258. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0890-3>
- Lee, M., Xu, Z., Wong, P., & Cleveland, D. (1993). Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *The Journal of cell biology*, 122(6), 1337–1350. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.6.1337>

- Lee, P. W., Selhorst, A., Lampe, S. G., Liu, Y., Yang, Y., & Lovett-Racke, A. E. (2020). Neuron-Specific Vitamin D Signaling Attenuates Microglia Activation and CNS Autoimmunity. *Frontiers in Neurology, 11*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00019>
- Levone, B. R., Cryan, J. F., & O'Leary, O. F. (2015). Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. *Neurobiology of Stress, 1*, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.11.003>
- Li, L., Guo, H., Lai, B., Liang, C., Chen, H., Chen, Y., Guo, W., Yuan, Z., Huang, R., Zeng, Z., Liang, L., Zhao, H., Zheng, X., Li, Y., Pu, Q., Qi, X., & Cai, D. (2022). Ablation of cardiomyocyte-derived BDNF during development causes myocardial degeneration and heart failure in the adult mouse heart. *Frontiers in Cardiovascular Medicine, 9*. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.967463>
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology, 6*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Li, X.-Y., Yin, X., Lu, J.-J., Li, Q.-R., Xing, W.-Q., Han, Q., Ji, H., Li, S.-Z., Yang, H.-M., Guo, J.-R., Wang, Z.-Q., & Xu, B. (2024). Ubiquitinome Analysis Uncovers Alterations in Synaptic Proteins and Glucose Metabolism Enzymes in the Hippocampi of Adolescent Mice Following Cold Exposure. *Cells, 13*(7), 570. <https://doi.org/10.3390/cells13070570>
- Li, Y., Li, F., Qin, D., Chen, H., Wang, J., Wang, J., Song, S., Wang, C., Wang, Y., Liu, S., Gao, D., & Wang, Z.-H. (2022). The role of brain derived neurotrophic factor in central nervous system. *Frontiers in Aging Neuroscience, 14*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.986443>
- Lian, S., Guo, J., Wang, L., Li, W., Wang, J., Ji, H., Kong, F., Xu, B., Li, S., & Yang, H. (2017). Impact of prenatal cold stress on placental physiology, inflammatory response, and apoptosis in rats. *Oncotarget, 8*(70), 115304–115314. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23257>
- Lian, S., Wang, D., Xu, B., Guo, W., Wang, L., Li, W., Ji, H., Wang, J., Kong, F., Zhen, L., Li, S., Zhang, L., Guo, J., & Yang, H. (2018). Prenatal cold stress: Effect on maternal

- hippocampus and offspring behavior in rats. *Behavioural Brain Research*, 346, 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.02.002>
- Lightman, S. L., Birnie, M. T., & Conway-Campbell, B. L. (2020). Dynamics of ACTH and Cortisol Secretion and Implications for Disease. *Endocrine Reviews*, 41(3).  
<https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa002>
- Lima, G. O., Menezes da Silva, A. L., Azevedo, J. E. C., Nascimento, C. P., Vieira, L. R., Hamoy, A. O., Oliveira Ferreira, L., Bahia, V. R. L. O., Muto, N. A., Lopes, D. C. F., & Hamoy, M. (2022). 100 YEARS OF VITAMIN D: Supraphysiological doses of vitamin D changes brainwave activity patterns in rats. *Endocrine Connections*, 11(3).  
<https://doi.org/10.1530/EC-21-0457>
- Lin, H.-J., Huang, C.-C., & Hsu, K.-S. (2006). Effects of neonatal dexamethasone treatment on hippocampal synaptic function. *Annals of Neurology*, 59(6), 939–951.  
<https://doi.org/10.1002/ana.20885>
- Lin, J. Q., Khuperkar, D., Pavlou, S., Makarchuk, S., Patikas, N., Lee, F. C., Zbiegły, J. M., Kang, J., Field, S. F., Bailey, D. M., Freeman, J. L., Ule, J., Metzakopian, E., Ruepp, M., & Mallucci, G. R. (2023). HNRNPH1 regulates the neuroprotective cold-shock protein RBM3 expression through poison exon exclusion. *The EMBO Journal*, 42(14).  
<https://doi.org/10.15252/embj.2022113168>
- Lindholm, P., & Lundgren, C. E. (2009). The physiology and pathophysiology of human breath-hold diving. *Journal of Applied Physiology*, 106(1), 284–292.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90991.2008>
- Liu, P., Yao, R., Shi, H., Liu, Y., Lian, S., Yang, Y., Yang, H., & Li, S. (2019). Effects of Cold-inducible RNA-binding Protein (CIRP) on Liver Glycolysis during Acute Cold Exposure in C57BL/6 Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1470.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20061470>
- Liu, W., Wang, X., O'Connor, M., Wang, G., & Han, F. (2020). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Potential Therapeutic Role in Stroke Comorbidities. *Neural Plasticity*, 2020, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2020/1969482>

- Liu, W., & Zhou, C. (2012). Corticosterone reduces brain mitochondrial function and expression of mitofusin, BDNF in depression-like rodents regardless of exercise preconditioning. *Psychoneuroendocrinology*, 37(7), 1057–1070. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.12.003>
- Liu, Y., Liu, P., Hu, Y., Cao, Y., Lu, J., Yang, Y., Lv, H., Lian, S., Xu, B., & Li, S. (2021). Cold-Induced RNA-Binding Protein Promotes Glucose Metabolism and Reduces Apoptosis by Increasing AKT Phosphorylation in Mouse Skeletal Muscle Under Acute Cold Exposure. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.685993>
- Liu, Y., Sanderson, D., Mian, M. F., McVey Neufeld, K.-A., & Forsythe, P. (2021). Loss of vagal integrity disrupts immune components of the microbiota-gut-brain axis and inhibits the effect of *Lactobacillus rhamnosus* on behavior and the corticosterone stress response. *Neuropharmacology*, 195, 108682. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108682>
- Logan, J. G., & Barksdale, D. J. (2008). Allostasis and allostatic load: expanding the discourse on stress and cardiovascular disease. *Journal of Clinical Nursing*, 17(7b), 201–208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2702.2008.02347.x>
- Lu, P., Jones, L. L., Snyder, E. Y., & Tuszynski, M. H. (2003). Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Experimental Neurology*, 181(2), 115–129. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00037-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00037-2)
- Lubkowska, A., Dołęgowska, B., Szyguła, Z., Bryczkowska, I., Stańczyk-Dunaj, M., Sałata, D., & Budkowska, M. (2013). Winter-swimming as a building-up body resistance factor inducing adaptive changes in the oxidant/antioxidant status. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 73(4), 315–325. <https://doi.org/10.3109/00365513.2013.773594>
- Ma, R., Zhao, L.-N., Yang, H., Wang, Y.-F., Hu, J., Zang, J., Mao, J.-G., Xiao, J.-J., & Shi, M. (2018). RNA binding motif protein 3 (RBM3) drives radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by reducing apoptosis via the PI3K/AKT/Bcl-2 signaling pathway. *American journal of translational research*, 10(12), 4130–4140.

- Mages, B., Aleithe, S., Altmann, S., Blietz, A., Nitzsche, B., Barthel, H., Horn, A. K. E., Hobusch, C., Härtig, W., Krueger, M., & Michalski, D. (2018). Impaired Neurofilament Integrity and Neuronal Morphology in Different Models of Focal Cerebral Ischemia and Human Stroke Tissue. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00161>
- Magomedova, L., & Cummins, C. L. (2015). *Glucocorticoids and Metabolic Control* W Herzig S., *Metabolic Control*, 1 Wyd., Springer Cham, Switzerland (s. 73–93). [https://doi.org/10.1007/164\\_2015\\_1](https://doi.org/10.1007/164_2015_1)
- Mahoney, C. R., Castellani, J., Kramer, F. M., Young, A., & Lieberman, H. R. (2007). Tyrosine supplementation mitigates working memory decrements during cold exposure. *Physiology & Behavior*, *92*(4), 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.003>
- Manjari, S. K. V., Maity, S., Poornima, R., Yau, S.-Y., Vaishali, K., Stellwagen, D., & Komal, P. (2022). Restorative Action of Vitamin D3 on Motor Dysfunction Through Enhancement of Neurotrophins and Antioxidant Expression in the Striatum. *Neuroscience*, *492*, 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.03.039>
- McEwen, B. S. (1998). Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *840*(1), 33–44. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x>
- McEwen, B. S. (2018). Redefining neuroendocrinology: Epigenetics of brain-body communication over the life course. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *49*, 8–30. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.11.001>
- McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2004). Molecular mechanisms of neuroplasticity and pharmacological implications: the example of tianeptine. *European Neuropsychopharmacology*, *14*, S497–S502. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2004.09.008>
- McEwen, B. S., & Gianaros, P. J. (2011). Stress- and Allostasis-Induced Brain Plasticity. *Annual Review of Medicine*, *62*(1), 431–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-052209-100430>

- McEwen, B. S., & Sapolsky, R. M. (1995). Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(2), 205–216. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80028-X](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80028-X)
- McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2007). Allostasis and Allostatic Load. W Fink G., 2 Wyd. *Encyclopedia of Stress* (s. 135–141). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00025-8>
- Mifsud, K. R., & Reul, J. M. H. M. (2018). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated control of genomic responses to stress in the brain. *Stress*, 21(5), 389–402. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1456526>
- Miranda, M., Morici, J. F., Zanoni, M. B., & Bekinschtein, P. (2019). Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00363>
- Mohd Azmi, N. A. S., Juliana, N., Azmani, S., Mohd Effendy, N., Abu, I. F., Mohd Fahmi Teng, N. I., & Das, S. (2021). Cortisol on Circadian Rhythm and Its Effect on Cardiovascular System. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(2), 676. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020676>
- MOISAN, M.-P., SECKL, J. R., & EDWARDS, C. R. W. (1990). 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Bioactivity and Messenger RNA Expression in Rat Forebrain: Localization in Hypothalamus, Hippocampus, and Cortex\*. *Endocrinology*, 127(3), 1450–1455. <https://doi.org/10.1210/endo-127-3-1450>
- Molnár, E. (2011). Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(5), 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2011.07.017>
- Morgan, D. J., Poolman, T. M., Williamson, A. J. K., Wang, Z., Clark, N. R., Ma'ayan, A., Whetton, A. D., Brass, A., Matthews, L. C., & Ray, D. W. (2016). Glucocorticoid receptor isoforms direct distinct mitochondrial programs to regulate ATP production. *Scientific Reports*, 6(1), 26419. <https://doi.org/10.1038/srep26419>
- Morgan, S. A., Gathercole, L. L., Hassan-Smith, Z. K., Tomlinson, J., Stewart, P. M., & Lavery, G. G. (2022). 11 $\beta$ -HSD1 contributes to age-related metabolic decline in male mice. *Journal of Endocrinology*, 255(3), 117–129. <https://doi.org/10.1530/JOE-22-0169>

- Mori, M., Shizunaga, H., Harada, H., Tajiri, Y., Murata, Y., Terada, K., Ohe, K., & Enjoji, M. (2022). Oxytocin treatment improves dexamethasone-induced depression-like symptoms associated with enhancement of hippocampal <scp>CREB-BDNF</scp> signaling in female mice. *Neuropsychopharmacology Reports*, 42(3), 356–361. <https://doi.org/10.1002/npr2.12271>
- Morin, C., Zini, R., Simon, N., Charbonnier, P., Tillement, J., & Louet, H. Le. (2000). Low glucocorticoid concentrations decrease oxidative phosphorylation of isolated rat brain mitochondria: an additional effect of dexamethasone. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 14(5), 493–500. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2000.tb00432.x>
- Mu, J.-S., Li, W.-P., Yao, Z.-B., & Zhou, X.-F. (1999). Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Research*, 835(2), 259–265. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01592-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01592-9)
- Naninck, E. F. G., Hoeijmakers, L., Kakava-Georgiadou, N., Meesters, A., Lazic, S. E., Lucassen, P. J., & Korosi, A. (2015). Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice. *Hippocampus*, 25(3), 309–328. <https://doi.org/10.1002/hipo.22374>
- Nieuwenhuis, I. L. C., & Takashima, A. (2011). The role of the ventromedial prefrontal cortex in memory consolidation. *Behavioural Brain Research*, 218(2), 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.12.009>
- Nishijima, T., Piriz, J., Dufлот, S., Fernandez, A. M., Gaitan, G., Gomez-Pinedo, U., Verdugo, J. M. G., Leroy, F., Soya, H., Nuñez, A., & Torres-Aleman, I. (2010). Neuronal Activity Drives Localized Blood-Brain-Barrier Transport of Serum Insulin-like Growth Factor-I into the CNS. *Neuron*, 67(5), 834–846. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.007>
- Nitta, A., Zheng, W., & Quirion, R. (2004). Insulin-like growth factor 1 prevents neuronal cell death induced by corticosterone through activation of the PI3k/Akt pathway. *Journal of Neuroscience Research*, 76(1), 98–103. <https://doi.org/10.1002/jnr.20057>
- Noti, M., Sidler, D., & Brunner, T. (2009). Extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestinal epithelium: more than a drop in the ocean? *Seminars in Immunopathology*, 31(2), 237–248. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0159-2>



- Numakawa, T., Suzuki, S., Kumamaru, E., Adachi, N., Richards, M., & Kunugi, H. (2010). BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histology and histopathology*, 25(2), 237–258. <https://doi.org/10.14670/HH-25.237>
- O'Brien, C., Mahoney, C., Tharion, W. J., Sils, I. V., & Castellani, J. W. (2007). Dietary tyrosine benefits cognitive and psychomotor performance during body cooling. *Physiology & Behavior*, 90(2–3), 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.09.027>
- Ohira, K., & Hayashi, M. (2009). A New Aspect of the TrkB Signaling Pathway in Neural Plasticity. *Current Neuropharmacology*, 7(4), 276–285. <https://doi.org/10.2174/157015909790031210>
- Pamenter, M. E., Lau, G. Y., & Richards, J. G. (2018). Effects of cold on murine brain mitochondrial function. *PLOS ONE*, 13(12), e0208453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208453>
- Panettieri, R. A., Schaafsma, D., Amrani, Y., Koziol-White, C., Ostrom, R., & Tliba, O. (2019). Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(1), 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.11.002>
- Paris, A. J., Hayer, K. E., Oved, J. H., Avgousti, D. C., Toulmin, S. A., Zepp, J. A., Zacharias, W. J., Katzen, J. B., Basil, M. C., Kremp, M. M., Slamowitz, A. R., Jayachandran, S., Sivakumar, A., Dai, N., Wang, P., Frank, D. B., Eisenlohr, L. C., Cantu, E., Beers, M. F., ... Worthen, G. S. (2020). STAT3–BDNF–TrkB signalling promotes alveolar epithelial regeneration after lung injury. *Nature Cell Biology*, 22(10), 1197–1210. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0569-x>
- Park, S.-E., Dantzer, R., Kelley, K. W., & McCusker, R. H. (2011). Central administration of insulin-like growth factor-I decreases depressive-like behavior and brain cytokine expression in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-12>
- Paul, S., Jeon, W. K., Bizon, J. L., & Han, J.-S. (2015). Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive

impairment. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7.  
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00043>

Pellerin, L., Pellegrini, G., Martin, J.-L., & Magistretti, P. J. (1998). Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: Support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3990–3995. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3990>

Peretti, D., Bastide, A., Radford, H., Verity, N., Molloy, C., Martin, M. G., Moreno, J. A., Steinert, J. R., Smith, T., Dinsdale, D., Willis, A. E., & Mallucci, G. R. (2015). RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration. *Nature*, 518(7538), 236–239. <https://doi.org/10.1038/nature14142>

Peretti, D., Smith, H. L., Verity, N., Humoud, I., de Weerd, L., Swinden, D. P., Hayes, J., & Mallucci, G. R. (2021). TrkB signaling regulates the cold-shock protein RBM3-mediated neuroprotection. *Life Science Alliance*, 4(4), e202000884. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000884>

Pérez, J. H., Swanson, R. E., Lau, H. J., Cheah, J., Bishop, V. R., Snell, K. R. S., Reid, A. M. A., Meddle, S. L., Wingfield, J. C., & Krause, J. S. (2019). Tissue specific expression of 11BHSD and its effects on plasma corticosterone during the stress response. *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.209346>

Pierrot-Deseilligny, C., & Souberbielle, J.-C. (2017). Vitamin D and multiple sclerosis: An update. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 14, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2017.03.014>

Pludowski, P., Grant, W. B., Konstantynowicz, J., & Holick, M. F. (2019). Editorial: Classic and Pleiotropic Actions of Vitamin D. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00341>

Płomiński, J., Grzybowski, R., Fiedorowicz, E., Sienkiewicz-Szłapka, E., Rozmus, D., Król-Grzymała, A., Jarmołowska, B., Kordulewska, N., & Cieślińska, A. (2022). Vitamin D Metabolic Pathway Components in Orthopedic Patients—Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15556. <https://doi.org/10.3390/ijms232415556>

- Pludowski, P., Ducki, C., Konstantynowicz, J., & Jaworski, M. (2016). Vitamin D status in Poland. *Polish Archives of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.20452/pamw.3479>
- Pludowski, P., Kos-Kudła, B., Walczak, M., Fal, A., Zozulińska-Ziółkiewicz, D., Sieroszewski, P., Peregud-Pogorzelski, J., Lauterbach, R., Targowski, T., Lewiński, A., Spaczyński, R., Wielgoś, M., Pinkas, J., Jackowska, T., Helwich, E., Mazur, A., Ruchała, M., Zygmunt, A., Szalecki, M., ... Misiorowski, W. (2023a). Guidelines for Preventing and Treating Vitamin D Deficiency: A 2023 Update in Poland. *Nutrients*, *15*(3), 695. <https://doi.org/10.3390/nu15030695>
- Pludowski, P., Kos-Kudła, B., Walczak, M., Fal, A., Zozulińska-Ziółkiewicz, D., Sieroszewski, P., Peregud-Pogorzelski, J., Lauterbach, R., Targowski, T., Lewiński, A., Spaczyński, R., Wielgoś, M., Pinkas, J., Jackowska, T., Helwich, E., Mazur, A., Ruchała, M., Zygmunt, A., Szalecki, M., ... Misiorowski, W. (2023b). Guidelines for Preventing and Treating Vitamin D Deficiency: A 2023 Update in Poland. *Nutrients*, *15*(3), 695. <https://doi.org/10.3390/nu15030695>
- Prüfer, K., Veenstra, T. D., Jirikowski, G. F., & Kumar, R. (1999). Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *16*(2), 135–145. [https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(99\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(99)00002-2)
- Psarra, A.-M. G., & Sekeris, C. E. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1813*(10), 1814–1821. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.05.014>
- Quesseveur, G., David, D. J., Gaillard, M. C., Pla, P., Wu, M. V, Nguyen, H. T., Nicolas, V., Auregan, G., David, I., Dranovsky, A., Hantraye, P., Hen, R., Gardier, A. M., Déglon, N., & Guiard, B. P. (2013). BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. *Translational Psychiatry*, *3*(4), e253–e253. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.30>
- Rahman, M. M., Callaghan, C. K., Kerskens, C. M., Chattarji, S., & O'Mara, S. M. (2016a). Early hippocampal volume loss as a marker of eventual memory deficits caused by repeated stress. *Scientific Reports*, *6*(1), 29127. <https://doi.org/10.1038/srep29127>

- Rahman, M. M., Callaghan, C. K., Kerskens, C. M., Chattarji, S., & O'Mara, S. M. (2016b). Early hippocampal volume loss as a marker of eventual memory deficits caused by repeated stress. *Scientific Reports*, *6*(1), 29127. <https://doi.org/10.1038/srep29127>
- Rauskolb, S., Zagrebelsky, M., Dreznjak, A., Deogracias, R., Matsumoto, T., Wiese, S., Erne, B., Sendtner, M., Schaeren-Wiemers, N., Korte, M., & Barde, Y.-A. (2010). Global Deprivation of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the CNS Reveals an Area-Specific Requirement for Dendritic Growth. *The Journal of Neuroscience*, *30*(5), 1739–1749. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5100-09.2010>
- Rigoulet, M., Bouchez, C. L., Paumard, P., Ransac, S., Cuvellier, S., Duvezin-Caubet, S., Mazat, J. P., & Devin, A. (2020). Cell energy metabolism: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1861*(11), 148276. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148276>
- Ristow, M., & Schmeisser, K. (2014). Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose-response: a publication of International Hormesis Society*, *12*(2), 288–341. <https://doi.org/10.2203/dose-response.13-035.Ristow>
- Rodwell, V. B. D., B. K., K. P., W. P. A. (2018). *Harper's Illustrated Biochemistry Thirty-First Edition*. McGraw Hill / Medical. New York, 121-131
- Rosenthal, L.-M., Leithner, C., Tong, G., Streitberger, K. J., Krech, J., Storm, C., & Schmitt, K. R. L. (2019). RBM3 and CIRP expressions in targeted temperature management treated cardiac arrest patients—A prospective single center study. *PLOS ONE*, *14*(12), e0226005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226005>
- Rusińska, A., Płudowski, P., Walczak, M., Borszewska-Kornacka, M. K., Bossowski, A., Chlebna-Sokół, D., Czech-Kowalska, J., Dobrzańska, A., Franek, E., Helwich, E., Jackowska, T., Kalina, M. A., Konstantynowicz, J., Książyk, J., Lewiński, A., Łukaszewicz, J., Marcinowska-Suchowierska, E., Mazur, A., Michałus, I., ... Zygmunt, A. (2018). Vitamin D Supplementation Guidelines for General Population and Groups at Risk of Vitamin D Deficiency in Poland—Recommendations of the Polish Society of Pediatric Endocrinology and Diabetes and the Expert Panel With Participation of

National Specialist Consultants and Representatives of Scientific Societies—2018 Update. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00246>

Salmon, W. D., & Daughaday, W. H. (1957). A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 49(6), 825–836. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13429201>

Sapolsky, R. M. (1996). Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion. *Stress*, 1(1), 1–19. <https://doi.org/10.3109/10253899609001092>

Sato, A. Y., Peacock, M., & Bellido, T. (2018). Glucocorticoid Excess in Bone and Muscle. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 16(1), 33–47. <https://doi.org/10.1007/s12018-018-9242-3>

Scher, A., Hall, W. A., Zaidman-Zait, A., & Weinberg, J. (2009). Sleep quality, cortisol levels, and behavioral regulation in toddlers. *Developmental Psychobiology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/dev.20410>

Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>

Schirò, G., Iacono, S., Ragonese, P., Aridon, P., Salemi, G., & Balistreri, C. R. (2022). A Brief Overview on BDNF-Trk Pathway in the Nervous System: A Potential Biomarker or Possible Target in Treatment of Multiple Sclerosis? *Frontiers in Neurology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.917527>

Schoenfeld, T. J., McCausland, H. C., Morris, H. D., Padmanaban, V., & Cameron, H. A. (2017). Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume. *Biological Psychiatry*, 82(12), 914–923. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.05.013>

Schubert, M. I., Kalisch, R., Sotiropoulos, I., Catania, C., Sousa, N., Almeida, O. F. X., & Auer, D. P. (2008). Effects of altered corticosteroid milieu on rat hippocampal neurochemistry and structure – An in vivo magnetic resonance spectroscopy and imaging study. *Journal of Psychiatric Research*, 42(11), 902–912. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2007.10.003>

- Schumacher, A., Villaruel, F. R., Ussling, A., Riaz, S., Lee, A. C. H., & Ito, R. (2018). Ventral Hippocampal CA1 and CA3 Differentially Mediate Learned Approach-Avoidance Conflict Processing. *Current Biology*, 28(8), 1318-1324.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.012>
- Selye, H. (1936). A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*, 138(3479), 32. <https://doi.org/10.1038/138032a0>
- Selye, H. (1976). *Stress without distress*. In: Serban, G. Psychopathology of Human Adaptation. Springer, Boston 137-146
- Selye Hans. (1979). *The Stress of My Life: A Scientist's Memoirs* (2. wyd.). Van Nostrand Reinhold 1-286.
- Senzai, Y. (2019). Function of local circuits in the hippocampal dentate gyrus-CA3 system. *Neuroscience Research*, 140, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.11.003>
- Seuter, S., Neme, A., & Carlberg, C. (2016). Epigenome-wide effects of vitamin D and their impact on the transcriptome of human monocytes involve CTCF. *Nucleic Acids Research*, 44(9), 4090–4104. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1519>
- Shattock, M. J., & Tipton, M. J. (2012). ‘Autonomic conflict’: a different way to die during cold water immersion? *The Journal of Physiology*, 590(14), 3219–3230. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.229864>
- Shi, H., Yao, R., Lian, S., Liu, P., Liu, Y., Yang, Y. Y., Yang, H., & Li, S. (2019). Regulating glycolysis, the TLR4 signal pathway and expression of RBM3 in mouse liver in response to acute cold exposure. *Stress*, 22(3), 366–376. <https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1568987>
- Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., Nakazato, M., Watanabe, H., Shinoda, N., Okada, S., & Iyo, M. (2003). Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry*, 54(1), 70–75. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00181-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00181-1)

- Shirayama, Y., Chen, A. C.-H., Nakagawa, S., Russell, D. S., & Duman, R. S. (2002). Brain-Derived Neurotrophic Factor Produces Antidepressant Effects in Behavioral Models of Depression. *The Journal of Neuroscience*, 22(8), 3251–3261. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-08-03251.2002>
- Shirazi, H. A., Rasouli, J., Ciric, B., Rostami, A., & Zhang, G.-X. (2015). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances neural stem cell proliferation and oligodendrocyte differentiation. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(2), 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.02.004>
- Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Murphy, M. P., Yamamoto, M., & Winterbourn, C. (2022). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(7), 499–515. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., & Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24(8), 1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>
- Sonoyama, T., Stadler, L. K. J., Zhu, M., Keogh, J. M., Henning, E., Hisama, F., Kirwan, P., Jura, M., Blaszczyk, B. K., DeWitt, D. C., Brouwers, B., Hyvönen, M., Barroso, I., Merkle, F. T., Appleyard, S. M., Wayman, G. A., & Farooqi, I. S. (2020). Human BDNF/TrkB variants impair hippocampal synaptogenesis and associate with neurobehavioural abnormalities. *Scientific Reports*, 10(1), 9028. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65531-x>
- Sousa, J. S., D’Imprima, E., & Vonck, J. (2018). *Mitochondrial Respiratory Chain Complexes* In: Harris, J., Boekema, E. (eds) *Membrane Protein Complexes: Structure and Function. Subcellular Biochemistry*, vol 87. Springer, Singapore. (s. 167–227). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_7)
- Spillane, M., Ketschek, A., Merianda, T. T., Twiss, J. L., & Gallo, G. (2013). Mitochondria Coordinate Sites of Axon Branching through Localized Intra-axonal Protein Synthesis. *Cell Reports*, 5(6), 1564–1575. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.022>

- Stemple, D. L., & Anderson, D. J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, *71*(6), 973–985. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90393-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90393-Q)
- Stojanović, O., Kieser, S., & Trajkovski, M. (2018). Common traits between the beige fat-inducing stimuli. *Current Opinion in Cell Biology*, *55*, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.05.011>
- Sturman, O., Germain, P.-L., & Bohacek, J. (2018). Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress*, *21*(5), 443–452. <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>
- Sun, L. Y., Al-Regaiey, K., Masternak, M. M., Wang, J., & Bartke, A. (2005). Local expression of GH and IGF-1 in the hippocampus of GH-deficient long-lived mice. *Neurobiology of Aging*, *26*(6), 929–937. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.07.010>
- Sun, Z., Zhao, S., Suo, X., & Dou, Y. (2022). Sirt1 protects against hippocampal atrophy and its induced cognitive impairment in middle-aged mice. *BMC Neuroscience*, *23*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12868-022-00718-8>
- Sureban, S. M., Ramalingam, S., Natarajan, G., May, R., Subramaniam, D., Bishnupuri, K. S., Morrison, A. R., Dieckgraefe, B. K., Brackett, D. J., Postier, R. G., Houchen, C. W., & Anant, S. (2008). Translation regulatory factor RBM3 is a proto-oncogene that prevents mitotic catastrophe. *Oncogene*, *27*(33), 4544–4556. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.97>
- Taborsky, B., English, S., Fawcett, T. W., Kuijper, B., Leimar, O., McNamara, J. M., Ruuskanen, S., & Sandi, C. (2021). Towards an Evolutionary Theory of Stress Responses. *Trends in Ecology & Evolution*, *36*(1), 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2020.09.003>
- Tagliaferri, S., Porri, D., De Giuseppe, R., Manuelli, M., Alessio, F., & Cena, H. (2019). The controversial role of vitamin D as an antioxidant: results from randomised controlled trials. *Nutrition Research Reviews*, *32*(1), 99–105. <https://doi.org/10.1017/S0954422418000197>
- Taherzadeh-Fard, E., Saft, C., Akkad, D. A., Wiczorek, S., Haghikia, A., Chan, A., Epplen, J. T., & Arning, L. (2011). PGC-1alpha downstream transcription factors NRF-1 and



- TFAM are genetic modifiers of Huntington disease. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-32>
- Tebben, P. J., Singh, R. J., & Kumar, R. (2016). Vitamin D-Mediated Hypercalcemia: Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *Endocrine Reviews*, 37(5), 521–547. <https://doi.org/10.1210/er.2016-1070>
- Tertil, M., Skupio, U., Barut, J., Dubovyk, V., Wawrzczak-Bargiela, A., Soltys, Z., Golda, S., Kudla, L., Wiktorowska, L., Szklarczyk, K., Korostynski, M., Przewlocki, R., & Slezak, M. (2018). Glucocorticoid receptor signaling in astrocytes is required for aversive memory formation. *Translational Psychiatry*, 8(1), 255. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0300-x>
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 341–360. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>
- Timmermans, S., Souffriau, J., & Libert, C. (2019). A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01545>
- Tong, L., Chuang, C.-C., Wu, S., & Zuo, L. (2015). Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Letters*, 367(1), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.008>
- Traiffort, E., Kassoussi, A., Zahaf, A., & Laouarem, Y. (2020). Astrocytes and Microglia as Major Players of Myelin Production in Normal and Pathological Conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00079>
- Trojan, E., Curzytek, K., Cieřlik, P., Wierońska, J. M., Graff, J., Lasoń, W., Saito, T., Saido, T. C., & Basta-Kaim, A. (2023). Prenatal stress aggravates age-dependent cognitive decline, insulin signaling dysfunction, and the pro-inflammatory response in the APPNL-F/NL-F mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 184, 106219. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106219>
- Troulinaki, K., & Bano, D. (2012). Mitochondrial deficiency: a double-edged sword for aging and neurodegeneration. *Frontiers in Genetics*, 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00244>

- Tsai, K.-J., Sze, C.-I., Lin, Y.-C., Lin, Y.-J., Hsieh, T.-H., & Lin, C.-H. (2016). A Single Postnatal Dose of Dexamethasone Enhances Memory of Rat Pups Later in Life. *PLOS ONE*, *11*(10), e0165752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165752>
- Tsatmali, M., Walcott, E. C., Makarenkova, H., & Crossin, K. L. (2006). Reactive oxygen species modulate the differentiation of neurons in clonal cortical cultures. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *33*(4), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.08.005>
- Tsiarli, M. A., Rudine, A., Kendall, N., Pratt, M. O., Krall, R., Thiels, E., DeFranco, D. B., & Monaghan, A. P. (2017). Antenatal dexamethasone exposure differentially affects distinct cortical neural progenitor cells and triggers long-term changes in murine cerebral architecture and behavior. *Translational Psychiatry*, *7*(6), e1153–e1153. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.65>
- Tsigos, C., Kyrou, I., Kassi, E., & Chrousos, G. P. (2000). *Stress: Endocrine Physiology and Pathophysiology*. [Updated 2020 Oct 17]. In: Feingold K.R., Anawalt B., Blackman M.R., Boyce A., Chrousos G., Corpas E., de Helder W.W., Dhatariya K., Dungan K., Hofland J., Kalra S., Kaltsas G., Kapoor N., Koch C., Kopp P., Korbonits M., Kovacs C.S., Kuohung W., Blandine Laferrère, Miles Levy, Elizabeth A McGee, Robert McLachlan, Maria New, Purnell J., Sahay R., Shah A.S., Singer F., Sperling M.A., Stratakis C.A., Trence D.L., Wilson D.P. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278995/>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Van Pelt, D. W., Confides, A. L., Judge, A. R., Vanderklish, P. W., & Dupont-Versteegden, E. E. (2018). Cold shock protein RBM3 attenuates atrophy and induces hypertrophy in skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *39*(1–2), 35–40. <https://doi.org/10.1007/s10974-018-9496-x>

- van Tulleken, C., Tipton, M., Massey, H., & Harper, C. M. (2018). Open water swimming as a treatment for major depressive disorder. *BMJ Case Reports*, bcr-2018-225007. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-225007>
- Wacker, M., & Holick, M. (2013). Vitamin D — Effects on Skeletal and Extraskelatal Health and the Need for Supplementation. *Nutrients*, 5(1), 111–148. <https://doi.org/10.3390/nu5010111>
- Wallace, D. C. (2015). Mitochondrial DNA Variation in Human Radiation and Disease. *Cell*, 163(1), 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.067>
- Wang Xinkun, & Michaelis Elias K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>
- Wang, Y.-C., Huang, C.-C., & Hsu, K.-S. (2010). The Role of Growth Retardation in Lasting Effects of Neonatal Dexamethasone Treatment on Hippocampal Synaptic Function. *PLoS ONE*, 5(9), e12806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012806>
- Warrington, T. P., & Bostwick, J. M. (2006). Psychiatric Adverse Effects of Corticosteroids. *Mayo Clinic Proceedings*, 81(10), 1361–1367. <https://doi.org/10.4065/81.10.1361>
- Wellmann, S., Bühner, C., Moderegger, E., Zelmer, A., Kirschner, R., Koehne, P., Fujita, J., & Seeger, K. (2004). Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *Journal of Cell Science*, 117(9), 1785–1794. <https://doi.org/10.1242/jcs.01026>
- Wilson, C., Núñez, M. T., & González-Billault, C. (2015). Contribution of NADPH-oxidase to the establishment of hippocampal neuronal polarity in culture. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.168567>
- Wyss, M. T., Jolivet, R., Buck, A., Magistretti, P. J., & Weber, B. (2011). *In Vivo* Evidence for Lactate as a Neuronal Energy Source. *The Journal of Neuroscience*, 31(20), 7477–7485. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0415-11.2011>

- Xia, W., Su, L., & Jiao, J. (2018). Cold-induced protein RBM3 orchestrates neurogenesis via modulating Yap mRNA stability in cold stress. *Journal of Cell Biology*, 217(10), 3464–3479. <https://doi.org/10.1083/jcb.201801143>
- Xu, B., Lang, L., Li, S.-Z., Guo, J.-R., Wang, J.-F., Wang, D., Zhang, L.-P., Yang, H.-M., & Lian, S. (2019a). Cortisol Excess-Mediated Mitochondrial Damage Induced Hippocampal Neuronal Apoptosis in Mice Following Cold Exposure. *Cells*, 8(6), 612. <https://doi.org/10.3390/cells8060612>
- Xu, B., Lang, L., Li, S.-Z., Guo, J.-R., Wang, J.-F., Wang, D., Zhang, L.-P., Yang, H.-M., & Lian, S. (2019b). Cortisol Excess-Mediated Mitochondrial Damage Induced Hippocampal Neuronal Apoptosis in Mice Following Cold Exposure. *Cells*, 8(6), 612. <https://doi.org/10.3390/cells8060612>
- Xu, B., Lang, L., Li, S.-Z., Guo, J.-R., Wang, J.-F., Wang, D., Zhang, L.-P., Yang, H.-M., & Lian, S. (2019c). Cortisol Excess-Mediated Mitochondrial Damage Induced Hippocampal Neuronal Apoptosis in Mice Following Cold Exposure. *Cells*, 8(6), 612. <https://doi.org/10.3390/cells8060612>
- Xu, B., Lang, L.-M., Lian, S., Guo, J.-R., Wang, J.-F., Yang, H.-M., & Li, S.-Z. (2019). Oxidation Stress-Mediated MAPK Signaling Pathway Activation Induces Neuronal Loss in the CA1 and CA3 Regions of the Hippocampus of Mice Following Chronic Cold Exposure. *Brain Sciences*, 9(10), 273. <https://doi.org/10.3390/brainsci9100273>
- Xu, B., Zang, S., Li, S.-Z., Guo, J.-R., Wang, J.-F., Wang, D., Zhang, L.-P., Yang, H.-M., & Lian, S. (2019). HMGB1-mediated differential response on hippocampal neurotransmitter disorder and neuroinflammation in adolescent male and female mice following cold exposure. *Brain, Behavior, and Immunity*, 76, 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.11.313>
- Yau, W. W., Wong, K. A., Zhou, J., Thimmukonda, N. K., Wu, Y., Bay, B.-H., Singh, B. K., & Yen, P. M. (2021). Chronic cold exposure induces autophagy to promote fatty acid oxidation, mitochondrial turnover, and thermogenesis in brown adipose tissue. *iScience*, 24(5), 102434. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102434>

- Yeh, C., Huang, C., & Hsu, K. (2012). Prenatal stress alters hippocampal synaptic plasticity in young rat offspring through preventing the proteolytic conversion of pro-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to mature BDNF. *The Journal of Physiology*, *590*(4), 991–1010. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.222042>
- Yin, F., Sancheti, H., Patil, I., & Cadenas, E. (2016). Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *100*, 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.200>
- Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, & Nixon, R. A. (2017). Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(4), a018309. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018309>
- Yuan, T., Ying, J., Jin, L., Li, C., Gui, S., Li, Z., Wang, R., Zuo, Z., & Zhang, Y. (2021). Correction for: The role of serum growth hormone and insulin-like growth factor-1 in adult humans brain morphology. *Aging*, *13*(18), 22623–22624. <https://doi.org/10.18632/aging.203601>
- Zelzer, S., Hofer, E., Meinitzer, A., Fritz-Petrin, E., Simstich, S., Goessler, W., Schmidt, R., & Herrmann, M. (2021). Association of vitamin D metabolites with cognitive function and brain atrophy in elderly individuals - the Austrian stroke prevention study. *Aging*, *13*(7), 9455–9467. <https://doi.org/10.18632/aging.202930>
- Zervides, K. A., Janelidze, S., Nystedt, J., Gullstrand, B., Nilsson, P., Sundgren, P. C., Bengtsson, A. A., Hansson, O., & Jönson, A. (2022). Plasma and cerebrospinal fluid neurofilament light concentrations reflect neuronal damage in systemic lupus Erythematosus. *BMC Neurology*, *22*(1), 467. <https://doi.org/10.1186/s12883-022-02998-3>
- Zhang, B., Zhang, Y., Xu, T., Yin, Y., Huang, R., Wang, Y., Zhang, J., Huang, D., & Li, W. (2017). Chronic dexamethasone treatment results in hippocampal neurons injury due to activate NLRP1 inflammasome in vitro. *International Immunopharmacology*, *49*, 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.05.039>

- Zhang, H., Zhao, Y., & Wang, Z. (2015). Chronic corticosterone exposure reduces hippocampal astrocyte structural plasticity and induces hippocampal atrophy in mice. *Neuroscience Letters*, 592, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.03.006>
- Zhao, A., Li, J., Wang, S., Bian, L., Li, W., & Guo, J. (2023). Stress can affect mitochondrial energy metabolism and AMPK/SIRT1 signaling pathway in rats. *Brain Research Bulletin*, 203, 110770. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.110770>
- Zhao, M., Choi, Y.-S., Obrietan, K., & Dudek, S. M. (2007). Synaptic Plasticity (and the Lack Thereof) in Hippocampal CA2 Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 27(44), 12025–12032. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4094-07.2007>
- Zheng, X., Boyer, L., Jin, M., Mertens, J., Kim, Y., Ma, L., Ma, L., Hamm, M., Gage, F. H., & Hunter, T. (2016). Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.13374>
- Zhu, X., Yan, J., Bregere, C., Zelmer, A., Goerne, T., Kapfhammer, J. P., Guzman, R., & Wellmann, S. (2019). RBM3 promotes neurogenesis in a niche-dependent manner via IMP2-IGF2 signaling pathway after hypoxic-ischemic brain injury. *Nature Communications*, 10(1), 3983. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11870-x>

# DOROBEK NAUKOWY

## Artykuły w czasopismach i rozdziały w monografiach

Publikacje opublikowana w czasopiśmie z listy ministerialnej wchodząca w skład dorobku będącego podstawą wszczęcia przewodu doktorskiego:

Karnia, M.J.; **Korewo, D.**; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* **2021**, *13*, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936> (IF = 4,8; MNiSzW = 140).

**Korewo-Labelle, D.**; Karnia, M.J.; Myślińska, D.; Kaczor, J.J. Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction i Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13941. <https://doi.org/10.3390/ijms241813941> (IF = 4,9; MNiSzW = 140)

**Łączna punktacja publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej: Impact Factor: 9,7; punktacja MEiN: 280**

Dorobek naukowy:

Karnia, M.J.; **Korewo, D.**; Myślińska, D.; Ciepielewski, Z.M.; Puchalska, M.; Konieczna-Wolska, K.; Kowalski, K.; Kaczor, J.J. The Positive Impact of Vitamin D on Glucocorticoid-Dependent Skeletal Muscle Atrophy. *Nutrients* **2021**, *13*, 936. <https://doi.org/10.3390/nu13030936> (IF = 4,8; MEiN = 140).

Banach, M.; Khaidakov, B.; **Korewo, D.**; Węsierska, M.; Cyplik, W.; Kujawa, J.; Ahrné, L.M.; Kujawski, W. The Chemical and Cytotoxic Properties of Sambucus nigra Extracts—A Natural Food Colorant. *Sustainability* **2021**, *13*, 12702. <https://doi.org/10.3390/su132212702> (IF = 3,3; MEiN = 70).

Bytowska Z.K., **Korewo-Labelle D.**, Berezka P., Kowalski K., Przewłócka K., Libionka W., Kloc W., Kaczor J.J. Effect of 12-Week BMI-Based Vitamin D<sub>3</sub> Supplementation in Parkinson's Disease with Deep Brain Stimulation on Physical Performance, Inflammation, and Vitamin D Metabolites. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 15;24(12):10200. doi: 10.3390/ijms241210200 (**IF=4,9; MEiN = 140**).

Bytowska Z.K., **Korewo-Labelle D.**, Kowalski K., Libionka W., Przewłócka K., Kloc W., Kaczor J.J. Impact of 12 Weeks of Vitamin D<sub>3</sub> Administration in Parkinson's Patients with Deep Brain Stimulation on Kynurenine Pathway i Inflammatory Status. *Nutrients.* 2023 Sep 2;15(17):3839. doi: 10.3390/nu15173839 (**IF = 4,8; MEiN = 140**).

**Korewo-Labelle, D.**; Karnia, M.J.; Myślińska, D.; Kaczor, J.J. Supplementation with Vitamin D<sub>3</sub> Protects against Mitochondrial Dysfunction and Loss of BDNF-Mediated Akt Activity in the Hippocampus during Long-Term Dexamethasone Treatment in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13941. <https://doi.org/10.3390/ijms241813941> (**IF = 4,9; MEiN = 140**)

Przewłócka, K.; **Korewo-Labelle, D.**; Berezka, P.; Karnia, M.J.; Kaczor, J.J. Current Aspects of Selected Factors to Modulate Brain Health and Sports Performance in Athletes. *Nutrients* **2024**, *16*, 1842. <https://doi.org/10.3390/nu16121842> (**IF = 4,8; MEiN = 140**)

**Łączna punktacja publikacji: Impact Factor: 27,5; punktacja MEiN: 800**