



Autoreferat

Katarzyna Socała

Zakład Fizjologii Zwierząt

Wydział Biologii i Biotechnologii

Lublin 2018

1. Imię i Nazwisko

Katarzyna Socała

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2011 stopień doktora nauk biologicznych

Zakład Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Rozprawa doktorska pt. „Wpływ sildenafilu na aktywność wybranych leków przeciwdepresyjnych w teście wymuszonego pływania u myszy”.

Promotor: prof. dr hab. Piotr Wlaź

2006 magister biologii (specjalność: biochemia)

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Praca magisterska pt. „Analiza proteolizy powierzchniowej owocników grzybów wielkoowocnikowych pod kątem skringingu gatunkowego, rytmu rocznego oraz strategii wzrostu grzyba”.

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Grzywnowicz

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2011–obecnie **adiunkt** w Zakładzie Fizjologii Zwierząt na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

2006–2011 **asystent** w Zakładzie Fizjologii Zwierząt na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowi cykl sześciu oryginalnych prac naukowych opublikowanych w czasopismach z listy JCR w latach 2015–2018. Sumaryczny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* prezentowanego cyklu wynosi 17,893, co odpowiada punktacji MNiSW = 170. We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondującym, a mój średni procentowy udział w prezentowanych publikacjach wynosi ok. 75%.

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Wpływ substancji pochodzenia naturalnego i syntetycznych na aktywność drgawkową w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

H1. Socała K*, Nieoczym D, Grzywnowicz K, Stefaniuk D, Wlaź P. (2015) Evaluation of anticonvulsant, antidepressant-, and anxiolytic-like effects of an aqueous extract from cultured mycelia of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) in mice. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 17(3):209-18

(IF₂₀₁₅ = 1,357; MNiSW₂₀₁₅ = 15 pkt) *autor korespondujący

H2. Socała K*, Nieoczym D, Pieróg M, Wlaź P. (2015) α -Spinasterol, a TRPV1 receptor antagonist, elevates the seizure threshold in three acute seizure tests in mice. *Journal of Neural Transmission* 122(9):1239-47

(IF₂₀₁₅ = 2,587; MNiSW₂₀₁₅ = 25 pkt) *autor korespondujący

H3. Socała K*, Szuster-Ciesielska A, Wlaź P. (2016) SB 334867, a selective orexin receptor type 1 antagonist, elevates seizure threshold in mice. *Life Sciences* 150:81-88

(IF₂₀₁₆ = 2,936; MNiSW₂₀₁₆ = 25 pkt) *autor korespondujący

H4. Socała K*, Nieoczym D, Kowalczuk-Vasilev E, Wyska E, Wlaź P. (2017) Increased seizure susceptibility and other toxicity symptoms following acute sulforaphane treatment in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 326:43-53

(IF₂₀₁₇ = 3,616; MNiSW₂₀₁₆ = 40 pkt) *autor korespondujący

H5. Socała K*, Nieoczym D, Pieróg M, Wyska E, Szafarz M, Doboszewska U, Wlaź P. (2018) Effect of tadalafil on seizure threshold and activity of antiepileptic drugs in three acute seizure tests in mice. *Neurotoxicity Research* 34(3):333-346

(IF₂₀₁₇ = 3,186; MNiSW₂₀₁₆ = 25 pkt) *autor korespondujący

H6. Socała K*, Mogilski S, Pieróg M, Nieoczym D, Abram M, Szulczyk B, Lubelska A, Latacz G, Doboszewska U, Wlaź P, Kamiński K. (2018) KA-11, a novel pyrrolidine-2,5-dione derived broad-spectrum anticonvulsant: its antiepileptogenic, antinociceptive properties and *in vitro* characterization. *ACS Chemical Neuroscience* doi: 10.1021/acschemneuro.8b00476

(IF₂₀₁₇ = 4,211; MNiSW₂₀₁₆ = 40 pkt) *autor korespondujący

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Padaczka to grupa zaburzeń neurologicznych, których głównym objawem są nawracające napady padaczkowe wywoływane nieprawidłową aktywnością elektryczną całego mózgu lub jednej jego struktury. Według danych epidemiologicznych jest ona drugą (po udarach mózgu) najczęściej występującą chorobą neurologiczną. Szacuje się, że cierpi na nią około 1% całej populacji ludzkiej [1]. Napad padaczkowy jest wyrazem nadmiernych, gwałtownych i zsynchronizowanych wyładowań w obrębie komórek nerwowych. Towarzyszą mu objawy kliniczne w postaci nie tylko zaburzeń ruchowych, ale również zmysłowych, wegetatywnych, poznawczych i pamięciowych [2, 3]. Etiologia padaczki jest złożona i uwzględnia się w niej wady strukturalne, czynniki genetyczne, infekcje, czynniki metaboliczne, dysfunkcje układu odpornościowego oraz czynniki nieznane [4].

Padaczka to heterogenna grupa zaburzeń o różnorodnym obrazie klinicznym, a sam termin „padaczka” może określać wiele zespołów i jednostek chorobowych o różnym patomechanizmie [5]. Według najnowszej klasyfikacji typów napadów padaczkowych, przedstawionej w 2017 roku przez Międzynarodową Ligę Przeciwpadaczkową (ILAE), wyróżnia się napady o początku ogniskowym, uogólnionym, nieznanym oraz napady

niesklasyfikowane [4, 5]. W napadach o początku ogniskowym (wcześniej zwanych napadami częściowymi) synchroniczne wyładowania grup komórek nerwowych rozpoczynają się w jednym lub kilku obszarach mózgu znajdujących się często w tylko jednej półkuli mózgowej [4]. Mogą one przebiegać z zachowaną lub zaburzoną świadomością i mieć początek ruchowy (napady z automatyzmami, atoniczne, kloniczne, napady zgięciowe, hiperkinetyczne, miokloniczne i toniczne) lub bez komponenty ruchowej (napady autonomiczne, zatrzymanie behawioralne, napady poznawcze, emocjonalne, czuciowe). Napady ogniskowe mogą przejść w obustronny napad toniczno-kloniczny (wcześniej nazywany napadem wtórnie uogólnionym). Napady o początku uogólnionym rozpoczynają się w obu półkach mózgowych równocześnie i zalicza się do nich napady ruchowe (toniczno-kloniczne, kloniczne, toniczne, miokloniczne, miokloniczno-toniczno-kloniczne, miokloniczno-atoniczne, atoniczne, napady zgięciowe) oraz napady bez manifestacji ruchowej (typowe, nietypowe, miokloniczne, mioklonie powiek). Wśród napadów o nieznanym początku wyróżnia się napady ruchowe (toniczno-kloniczne, napady zgięciowe), a także napady bez objawów ruchowych (zatrzymanie behawioralne) [4-6].

Napady padaczkowe z punktu widzenia neurochemicznego są wynikiem zaburzonej równowagi pomiędzy procesami pobudzenia i hamowania w ośrodkowym układzie nerwowym spowodowanej m.in. zmianami w obrębie neurotransmisji glutaminianergicznej i GABA-ergicznej, zaburzeniami czynności kanałów i pomp jonowych i/lub zaburzeniami metabolizmu i stanu energetycznego komórki. W neurobiologii napadów padaczkowych mogą być również zaangażowane inne neuroprzekaźniki i neuromodulatory (jak np. monoaminy, acetylocholina, adenozyzna, neuropeptydy, neurotrofiny), komórki glejowe oraz cały szereg innych czynników [2, 7, 8].

Farmakoterapia jest obecnie podstawową formą leczenia padaczki, a jej głównym celem jest zmniejszenie częstości i natężenia napadów padaczkowych przy zachowaniu jak najmniejszej liczby działań niepożądanych. Na rynku dostępne są liczne leki przeciwpadaczkowe, które zwyczajowo dzieli się na leki starszej generacji (np. kwas walproinowy, karbamazepina, benzodiazepiny, fenytoina, fenobarbital czy etosuksymid) oraz leki nowej generacji, wprowadzane do leczenia od lat 90. XX wieku (np. lamotrygina, topiramata, okskarbazepina, lewetiracetam, gabapentyna, tiagabina, felbamat czy zonisamid). Leki przeciwpadaczkowe nowej generacji odznaczają się z reguły lepszą tolerancją

oraz korzystniejszym profilem farmakokinetycznym, rzadziej wywołują też działania niepożądane [9].

Główne mechanizmy działania leków przeciwpadaczkowych obejmują: (a) modulowanie pobudliwości błony komórkowej neuronów poprzez wpływ na kanały jonowe (głównie sodowe, ale również w pewnym stopniu wapniowe i potasowe), (b) nasilanie neurotransmisji GABA-ergicznej (poprzez zwiększanie ilości GABA w szczelinie synaptycznej, bezpośrednio pobudzanie receptorów GABA_A lub ich allosteryczną modulację) i (c) hamowanie neurotransmisji glutaminianergicznej (głównie poprzez wpływ na jonotropowe receptory dla kwasu glutaminowego). Warto jednak wspomnieć, że dokładny mechanizm działania niektórych leków przeciwpadaczkowych nadal nie jest do końca znany [2, 9, 10].

Choć na rynku dostępnych jest ponad 20 różnych leków przeciwpadaczkowych, to analiza ich skuteczności pokazuje, że kontrolę napadów udaje się osiągnąć tylko u ok. 60–70% pacjentów przyjmujących jeden lek. Wielu pacjentów wymaga zatem skojarzonego leczenia dwoma lub trzema lekami. Niestety u wielu z nich również nie uzyskuje się wystarczającej poprawy, a taką postać choroby określa się mianem padaczki lekoopornej [11, 12]. Ze względu na dużą częstość występowania, i związane z tym następstwa, zjawisko lekooporności pozostaje jednym z głównych problemów terapii padaczki. Kolejnym problemem związanym z farmakoterapią padaczki jest fakt, że leki przeciwpadaczkowe mogą niekiedy powodować poważne działania niepożądane lub wchodzić w interakcje z innymi lekami, co może skutkować przerwaniem leczenia przeciwpadaczkowego [13, 14]. Ponadto leczenie padaczki ma charakter głównie objawowy, ponieważ większość leków przeciwpadaczkowych znosi lub ogranicza liczbę napadów, ale nie zapobiega zjawisku epileptogenezy, czyli zmianom zachodzącym w neuronach po zadziałaniu czynnika uszkodzającego, które prowadzą do rozwoju padaczki [15].

Padaczka jest chorobą, która niewątpliwie wpływa na jakość życia pacjentów i to we wszystkich jego obszarach, tj. fizycznym, psychicznym i społecznym. Obawa przed napadami padaczkowymi może, choć nie musi, prowadzić do zaprzestania edukacji, rezygnacji z pracy zawodowej oraz izolacji społecznej chorego. Wśród pacjentów z padaczką obserwuje się między innymi większą częstość występowania depresji czy zaburzeń

lękowych [16]. Również ryzyko śmierci jest 2–3 razy wyższe niż w populacji ogólnej. Bardzo niepokojącym zjawiskiem jest natomiast zespół nagłej nieoczekiwanej śmierci w padaczkę (SUDEP), który definiowany jest jako nagły, nieoczekiwany zgon, w obecności lub bez udziału świadków, z towarzyszącymi napadami lub bez nich, niezwiązany z urazem czy utonięciem i niebędący konsekwencją potwierdzonego stanu padaczkowego czy też zaburzeń strukturalnych lub toksykologicznych [17]. Częstym problemem osób chorujących na padaczkę są również zaburzenia funkcji poznawczych, które mogą być spowodowane tym samym czynnikiem, który wywołał padaczkę, zmianami zachodzącymi na poziomie molekularnym i komórkowym w przebiegu padaczki lub też są następstwem stosowania leków przeciwpadaczkowych. Deficyty poznawcze mogą przyczyniać się do gorszych zdolności adaptacyjnych i gorszego funkcjonowania społecznego osób chorych na padaczkę, a co za tym idzie do pogorszenia jakości życia [18, 19].

Pomimo ogromnego postępu w dziedzinie nauk biomedycznych, jaki dokonał się na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat, padaczka nadal stanowi poważne wyzwanie dla współczesnej neurologii i neurofarmakologii. Intensywnie prowadzone badania przynoszą coraz to nowsze dane na temat patomechanizmu napadów padaczkowych, ale jednocześnie generują nowe pytania. Dodatkowo efektywność obecnie stosowanych metod leczenia jest niezadowalająca, często obarczona licznymi działaniami niepożądanymi, a jakość życia wielu osób chorych na padaczkę zdecydowanie obniżona. Dlatego konieczne są badania mające na celu lepsze poznanie mechanizmów leżących u podstaw powstawania padaczki i napadów padaczkowych, a także poszukiwanie lub synteza nowych, skuteczniejszych i bezpieczniejszych leków przeciwpadaczkowych.

W związku z powyższym celem badań, których wynikiem jest osiągnięcie naukowe, będące przedmiotem przedłożonego wniosku, była ocena wpływu wybranych substancji na aktywność drgawkową w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych. Badania te miały za zadanie:

- a. wskazać związki, które mogą posiadać potencjał przeciwdrgawkowy i mogą być dobrymi kandydatami do dalszych badań w procesie poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych;

- b. wskazać związki, które mogą posiadać potencjał prodrógawkowy i mogą stwarzać zagrożenie w postaci obniżenia progu drógawkowego, zwiększając tym samym ryzyko napadów padaczkowych.

Do badań zostały wyselekcjonowane zarówno związki/preparaty pochodzenia naturalnego (publikacje **H1**, **H2** i **H4**), jak i syntetyczne (publikacje **H3**, **H5** i **H6**). Ponieważ padaczka jest chorobą niejednorodną, a charakter napadów może być bardzo różny, wykorzystano kilka modeli drógawek padaczkowych, aby sprawdzić wpływ badanych substancji na różne rodzaje drógawek u myszy. Zastosowane zostały następujące testy:

- Test progu drógawek indukowanych dożylną (i.v.) infuzją pentylenetetrazolu (PTZ)

PTZ jest niekompetycyjnym antagonistą receptora GABA_A, ale dokładny mechanizm jego działania nie jest do końca znany [20]. Związek ten wywołuje u zwierząt doświadczalnych drógawki, które naśladują mioklonie oraz uogólnione napady toniczno-kloniczne u ludzi. Oznaczanie progu drógawkowego w teście i.v. PTZ stanowi bardzo czułą metodę pozwalającą na wyznaczenie progu pobudliwości drógawkowej aż trzech rodzajów napadów drógawkowych: (a) mioklonicznych, (b) uogólnionych drógawek klonicznych z utratą postawy ciała oraz (c) drógawek tonicznych manifestujących się tonicznym wyprostem kończyn przednich, po którym natychmiast występuje toniczny wyprost kończyn tylnych. Próg drógawkowy w tym teście wyrażany jest w postaci dawki PTZ (w mg/kg) potrzebnej do wywołania ww. rodzajów aktywności drógawkowej [21]. Model ten został wykorzystany w publikacjach **H1–H6**.

- Test maksymalnego wstrząsu elektrycznego

Drogawki w tym teście wywołane są bodźcem elektrycznym (50 Hz; 0,2 s). Rozpoczynają się one skurczem kończyn przednich i tylnych, po których szybko następuje toniczny ich wyprost. Maksymalne drógawki elektryczne są powszechnie akceptowanym modelem uogólnionych napadów toniczno-klonicznych u ludzi [22]. W teście progu maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MEST) wyznaczana jest mediana natężenia prądu (CS₅₀), tj. natężenie prądu (w mA) potrzebne do wywołania drógawek maksymalnych, czyli tonicznego wyprostów kończyn tylnych u 50% badanych zwierząt. Test MEST wykorzystany został w publikacjach **H1-H5**. Test maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) może natomiast służyć do wyznaczania mediany dawek skutecznych (ED₅₀) leków przeciwpadaczkowych, czyli dawek

(w mg/kg), które chronią 50% badanych zwierząt przed tonusem kończyn tylnych. Test MES wykorzystany został w pracach **H4 i H5**.

- Test drgawek indukowanych prądem o częstotliwości 6 Hz

W modelu tym bodźce elektryczne o długim czasie trwania (3 s) i niskiej częstotliwości prądu (6 Hz) indukują drgawki określane mianem psychomotorycznych. Objawiają się one u zwierząt doświadczalnych zniechęceniem, stereotypowymi zachowaniami i minimalnymi drgawkami klonicznymi. Drgawki indukowane prądem o częstotliwości 6 Hz uznawane są za model napadów ogniskowych (limbicznych) u ludzi [23]. W teście progu drgawek indukowanych prądem o częstotliwości 6 Hz (wykorzystanym w publikacjach **H1–H5**) wyznaczana jest wartość CS_{50} , czyli natężenie prądu (w mA) potrzebne do wywołania drgawek psychomotorycznych u 50% badanych zwierząt. Test drgawek 6 Hz przy natężeniu bodźca 32 mA (wykorzystany w publikacjach **H4 i H5**) może natomiast służyć do wyznaczania wartości ED_{50} leków przeciwpadaczkowych, czyli dawek (w mg/kg), które chronią 50% badanych zwierząt przed drgawkami psychomotorycznymi. Test drgawek 6 Hz uważany jest również za model drgawek lekoopornych, ale ostatnio użyteczność tego testu w badaniach substancji przeciwpadaczkowych, które mogłyby być skuteczne w leczeniu padaczki lekoopornej jest coraz bardziej kwestionowana [24].

- Model drgawek rozniecanych indukowanych PTZ (tzw. kindling)

W modelu tym zwierzęta poddawane są przewlekłej ekspozycji na podprogowe dawki PTZ, w następstwie czego dochodzi do powstania i stopniowego wzmocnienia procesów drgawkowych. Uważa się, że dochodzi wówczas do plastycznych zmian w pobudliwości tkanki mózgowej, co przypomina proces rozwoju padaczki u człowieka [25, 26]. Model drgawek rozniecanych indukowanych wielokrotnym podawaniem PTZ jest jednym z najczęściej stosowanych modeli epileptogenezy. Model ten wykorzystany został w publikacji **H6**.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wraz z uzasadnieniem wyboru danej substancji do badań zostały zaprezentowane poniżej.

H1. Socała K, Nieoczym D, Grzywnowicz K, Stefaniuk D, Wlaź P. (2015) Evaluation of anticonvulsant, antidepressant-, and anxiolytic-like effects of an aqueous extract from cultured mycelia of the Lingzhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) in mice. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 17(3):209-18

Grzyb *Ganoderma lucidum* (zwany również Lingzhi lub Reishi) jest znany w medycynie Dalekiego Wschodu od ponad 2000 lat. Jest to obecnie najlepiej przebadany i najczęściej stosowany grzyb leczniczy. Na rynku dostępna jest szeroka gama produktów zawierających grzybnię, owocniki lub zarodniki *G. lucidum* w postaci sproszkowanej lub ekstraktów [27]. Grzyb ten jest stosowany w leczeniu szeregu schorzeń, przy czym szczególnie interesujące wydaje się być zastosowanie *G. lucidum* w terapii chorób cywilizacyjnych, tj. nowotworów, cukrzycy i chorób układu sercowo-naczyniowego [27, 28]. Liczne i różnorodne właściwości farmakologiczne *G. lucidum* są związane z tym, że grzyb ten jest niezwykle bogaty w związki biologiczne aktywne, a zwłaszcza polisacharydy i triterpeny [28-31]. Związki te mogą również wywierać wpływ na funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego. Neuroprotektoryjne właściwości preparatów z *G. lucidum* [32-34] oraz odnotowana przez Aguirre Moreno i wsp. [35] zdolność *G. lucidum* do hamowania drgawek indukowanych podaniem kwasu kainowego u szczurów sugerowały, że grzyb ten może również przynieść pozytywne efekty w leczeniu padaczki.

W celu poszerzenia wiedzy na temat ewentualnych przeciwdrgawkowych właściwości *G. lucidum* w ramach doświadczeń opisanych w publikacji **H1** zbadano wpływ wodnego ekstraktu z grzybni *G. lucidum* (wyhodowanej w Zakładzie Biochemii Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie) na próg drgawkowy w trzech opisanych powyżej modelach drgawek u myszy, a mianowicie w teście i.v. PTZ, w teście MEST oraz w teście progu drgawek indukowanych prądem o częstotliwości 6 Hz. Otrzymane wyniki pokazały, że ekstrakt wodny z grzybni *G. lucidum* podawany dożołądkowo w dawkach 200, 400 i 600 mg/kg nie wpływa w sposób istotny statystycznie na próg drgawek mioklonicznych, uogólnionych drgawek klonicznych oraz próg drgawek tonicznych w teście i.v. PTZ u myszy. Nie zaobserwowano również istotnego wpływu *G. lucidum* (w dawkach 200, 400 i 600 mg/kg) na próg tonicznego wyprostowania kończyn tylnych w teście MEST. Badany ekstrakt (w dawkach 100, 200 i 400 mg/kg) podnosił jednak w sposób istotny statystycznie próg drgawek psychomotorycznych

indukowanych prądem o częstotliwości 6 Hz. Brak wpływu badanego ekstraktu na próg drgawek klonicznych i tonicznych oraz jednoczesny wzrost progu dla drgawek psychomotorycznych po podaniu *G. lucidum* może być związany z tym, że drgawki te wywodzą się z różnych struktur ośrodkowego układu nerwowego. Drgawki kloniczne są wynikiem zaburzeń w obrębie przodomózgowia, drgawki toniczne wywodzą się ze struktur pnia mózgu, a drgawki psychomotoryczne z układu limbicznego [21, 23, 36]. Być może miejsce działania związków aktywnych zawartych w badanym ekstrakcie z grzybni *G. lucidum* ograniczyło się do struktur układu limbicznego, ale ta kwestia wymagałaby dalszych szczegółowych badań. Ponieważ związki o działaniu przeciwdrgawkowym mogą powodować działania niepożądane w postaci zaburzeń koordynacji ruchowej, zmian siły mięśniowej lub sedacji zbadany został również wpływ wyciągu z *G. lucidum* na te parametry. Badany ekstrakt w zakresie testowanych dawek nie wpływał na koordynację ruchową, siłę mięśni szkieletowych oraz aktywność ruchową myszy.

Podsumowując, wyniki badań opisanych w publikacji **H1** pokazały, że wodny ekstrakt z grzybni *G. lucidum* posiada jedynie słabe właściwości przeciwdrgawkowe, ponieważ preparat ten podwyższał próg drgawkowy wyłącznie w teście drgawek psychomotorycznych indukowanych prądem o częstotliwości 6 Hz. Wyniki te nie potwierdziły niestety wcześniejszego doniesienia o potencjale przeciwpadaczkowym *G. lucidum* [35].

H2. Socała K, Nieoczym D, Pieróg M, Wlaź P. (2015) α -Spinasterol, a TRPV1 receptor antagonist, elevates the seizure threshold in three acute seizure tests in mice. *Journal of Neural Transmission* 122(9):1239-47

α -Spinasterol jest fitosterolem obecnym w wielu roślinach m.in. w liściach szpinaku i lucernie [37]. Związek ten wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, a także przeciwbólowe [38-41]. Jego mechanizm działania związany jest ze zdolnością do selektywnego hamowania aktywności receptora waniloidowego typu pierwszego (ang. *transient receptor potential vanilloid subtype 1*, TRPV1). Receptory TRPV1 to kanały jonowe przepuszczalne głównie dla kationów dwuwartościowych. Są one obecne zarówno w obrębie ośrodkowego jak i obwodowego układu nerwowego i następstwem ich aktywacji jest depolaryzacja błony komórkowej. Istnieje wiele ligandów/aktywatorów receptora TRPV1, jak np. kapsaicyna, wysoka temperatura, niskie pH czy endokannabinoidy [42, 43].

Receptory te są szeroko badane jako punkt uchwytu dla nowych leków przeciwbólowych, ale istnieją również dane wskazujące na ich potencjalny udział w patomechanizmie padaczki. Stwierdzono między innymi, że antagoniści receptora TRPV1 hamują drgawki indukowane 4-aminopirydyną u myszy oraz spowalniają proces rozniecania w modelu drgawek rozniecanych z ciała migdałowatego i za pomocą PTZ u szczurów, podczas gdy agoniści receptora TRPV1 wykazują działanie odwrotne [44, 45]. Podstawową wadą wielu dostępnych komercyjnie antagonistów receptora TRPV1, w tym również tych wykorzystanych w ww. pracach, jest ich słaba penetracja przez barierę krew-mózg oraz działanie niepożądane w postaci hipertermii. α -Spinasterol przenika barierę krew-mózg i jest aktywny po podaniu systemowym, a ponadto nie powinien wywierać wpływu na ciepłotę ciała [46].

W związku z powyższym w ramach pracy **H2** zbadano wpływ α -spinasterolu podawanego dootrzewnowo (i.p.) na próg drgawkowy w trzech doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych u myszy, tj. w teście i.v. PTZ, w teście MEST oraz w teście progu drgawek psychomotorycznych wywołanych prądem elektrycznym o częstotliwości 6 Hz. W celu określenia niepożądanych efektów działania α -spinasterolu oceniono również jego wpływ na koordynację ruchową, siłę mięśni szkieletowych i temperaturę ciała.

Otrzymane wyniki pokazały, że α -spinasterol podawany systemowo wywiera wpływ na aktywność drgawkową u myszy. Związek ten (w zakresie dawek 0,1–1 mg/kg) podnosił próg pobudliwości drgawkowej dla drgawek mioklonicznych w teście i.v. PTZ. α -Spinasterol (w dawkach 0,5 i 1 mg/kg) podwyższał również próg uogólnionych drgawek klonicznych w tym teście, ale pozbawiony był wpływu na próg drgawek tonicznych objawiających się tonicznym wyprostem kończyn przednich. Badany związek (w dawkach 0,5 i 1 mg/kg) podnosił jednak próg dla drgawek tonicznych w teście MEST, a w dawkach 0,1 i 0,5 mg/kg powodował również wzrost progu pobudliwości drgawkowej w teście drgawek psychomotorycznych indukowanych prądem o częstotliwości 6 Hz. α -Spinasterol (w zakresie dawek 0,01–1 mg/kg) nie wywierał jednocześnie działań niepożądanych. Nie zaobserwowano upośledzenia koordynacji ruchowej oraz zmian w sile mięśni szkieletowych. α -Spinasterol nie powodował również hipertermii, co potwierdziło odnotowany wcześniej brak wpływu tego związku na temperaturę ciała [46]. Wykazany w pracy **H2** brak wpływu α -spinasterolu na próg drgawek tonicznych w teście i.v. PTZ przy jednoczesnym podnoszeniu progu drgawek tonicznych w teście MEST sugeruje,

że związek ten wpływa na drgawki toniczne raczej poprzez oddziaływanie na kanały sodowe aniżeli na przekąźnictwo GABA-ergiczne.

Podsumowując, wyniki badań opisanych w publikacji **H2** pokazały, że α -spinasterol (selektywny antagonist receptor TRPV1) podwyższa próg pobudliwości drgawkowej dla różnych rodzajów drgawek, co sugeruje, że związek ten może posiadać szerokie spektrum działania przeciwdrgawkowego. Otrzymane rezultaty wspierają również tezę o możliwości hamowania drgawek padaczkowych poprzez blokowanie receptorów TRPV1, a α -spinasterol wydaje się być dobrym narzędziem farmakologicznym do dalszych badań nad rolą tego receptora w patomechanizmie padaczki.

H3. Socała K, Szuster-Ciesielska A, Wlaź P. (2016) SB 334867, a selective orexin receptor type 1 antagonist, elevates seizure threshold in mice. *Life Sciences* 150:81-88

Oreksyny (inaczej hipokretyny) 1 i 2 to neuropeptydy produkowane przez niewielką grupę neuronów bocznej części podwzgórza. Podwzgórzowe neurony oreksynowe docierają do wielu struktur mózgowia, co sprawia, że oreksyny pełnią szereg istotnych funkcji w organizmie, jak np. regulacja apetytu czy kontrola snu i czuwania [47, 48]. Obecność włókien oreksynowych oraz receptorów oreksynowych OX1 i OX2 stwierdzona została w strukturach, które odgrywają ważną rolę w patomechanizmie padaczki, np. w hipokampie [49]. Deprywacja snu może przyczyniać się do wystąpienia drgawek zarówno u zwierząt doświadczalnych jak i u ludzi [50]. Przypuszcza się, że to właśnie receptory oreksynowe mogą być zaangażowane w to zjawisko. Zaobserwowano, że antagoniści receptorów oreksynowych wykazują działanie przeciwdrgawkowe u szczurów poddanych deprywacji snu [51]. Pokazano również, że oreksyny podawane domózgowo wywołują drgawki u szczurów [52] i potęgują drgawki indukowane penicyliną [53], a selektywni antagoniści receptorów OX1 i OX2 wykazują działanie przeciwdrgawkowe w modelu drgawek indukowanych PTZ u szczurów [54]. Co ciekawe, almoreksant (antagonista zarówno receptorów OX1 jak i OX2) był pozbawiony działania przeciwdrgawkowego w teście drgawek indukowanych pilokarpiną u myszy [55]. Badania kliniczne dostarczają natomiast sprzecznych wyników, ponieważ odnotowywany był zarówno spadek, jak i wzrost poziomu oreksyny 1 w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów po napadach drgawkowych [56, 57].

W związku z powyższym w ramach badań opisanych w pracy **H3** oceniono rolę receptorów oreksynowych OX1 w generowaniu aktywności drgawkowej poprzez określenie wpływu SB 334867 (selektywnego antagonisty receptora OX1) na próg drgawkowy u myszy w trzech modelach drgawek, tj. w modelu i.v. PTZ, w teście MEST oraz w teście progu drgawek psychomotorycznych wywołanych prądem elektrycznym o częstotliwości 6 Hz. W celu pełniejszego poznania znaczenia układu oreksynowego w mechanizmie powstawania różnych typów napadów drgawkowych, oznaczono również poziom oreksyny A (w ramach współpracy z prof. dr hab. Agnieszką Szuster-Ciesielską z Zakładu Wirusologii i Immunologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie) w mózгах zwierząt przed i po atakach drgawkowych.

Otrzymane wyniki pokazały, że SB 334867 podawany i.p. w dawkach 3, 10 i 30 mg/kg nie wpływał w sposób istotny statystycznie na próg drgawek mioklonicznych oraz tonicznych w teście i.v. PTZ. W tym samym teście, związek ten podany w najwyższej dawce (30 mg/kg) podnosił próg pobudliwości drgawkowej dla uogólnionych drgawek klonicznych. Dla porównania zbadano również wpływ selektywnego antagonisty receptorów OX2 (EMPA) na aktywność drgawkową w teście i.v. PTZ. Związek ten (podawany w dawkach 10, 30 i 50 mg/kg) nie wpływał jednak na progi pobudliwości drgawkowej w tym modelu. SB 334867 w dawkach 30 i 50 mg/kg spowodował natomiast istotny statystycznie wzrost progu dla drgawek tonicznych w teście MEST. W niższych dawkach, tj. 3 i 10 mg/kg, SB 334867 podnosił również próg drgawkowy w teście drgawek psychomotorycznych. Badany związek (w zakresie dawek 1–50 mg/kg) nie wykazywał działania w teście komina i teście siły chwytu, co sugeruje, że blokada receptora OX1 nie powoduje działań niepożądanych w postaci upośledzenia koordynacji ruchowej czy zmian w sile mięśni szkieletowych. Odnotowano ponadto wyraźny wzrost poziomu oreksyny A w mózгах myszy po wszystkich rodzajach drgawek.

Podsumowując, wyniki badań opisanych w publikacji **H3** pokazały, że blokada receptorów OX1 za pomocą selektywnego antagonisty SB 334867 podnosi próg pobudliwości drgawkowej w trzech różnych modelach drgawek u myszy. Wykazano także, że poziom oreksyny A w mózгах myszy wzrasta po różnych rodzajach napadów drgawkowych. Wydaje się zatem, że receptory oreksynowe OX1 mogą stanowić nowy punkt uchwytu dla leków przeciwpadaczkowych.

H4. Socafa K*, Nieoczym D, Kowalczuk-Vasilev E, Wyska E, Wlaź P. (2017) Increased seizure susceptibility and other toxicity symptoms following acute sulforaphane treatment in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 326:43-53

Sulforafan jest związkiem pochodzenia roślinnego, który występuje w roślinach krzyżowych, a szczególnie obficie w brokułach. Związek ten był i nadal jest przedmiotem licznych badań ze względu na swoje właściwości przeciwnowotworowe i chemoprewencyjne. Obecnie na rynku dostępne są liczne suplementy diety zawierające sulforafan [58]. Związek ten uważany jest powszechnie za bezpieczny i dobrze tolerowany, choć jego toksyczność nigdy nie była przedmiotem badań [59-61]. Sulforafan przenika barierę krew-mózg i może wywierać również działanie ośrodkowe [62]. Jego mechanizm działania wiąże się przede wszystkim ze szlakiem Nrf2-ARE. Sulforafan aktywuje czynnik transkrypcyjny Nrf2, który kontroluje geny zawierające w swych promotorach sekwencję ARE, w tym geny kodujące enzymy antyoksydacyjne [63, 64]. Sugeruje się, że szlak Nrf2-ARE może być zaangażowany w patomechanizm wielu chorób ośrodkowego układu nerwowego, w tym padaczki [6]. Pokazano między innymi, że sulforafan spowalnia proces epileptogenezy w modelu drgawek rozniecanych z ciała migdałowatego u szczurów [65] oraz wykazuje działanie przeciwdrgawkowe w kilku mysich modelach drgawek padaczkowych [66]. W doświadczeniach tych sulforafan podawany był wielokrotnie, w niewielkiej dawce (5 mg/kg).

Biorąc powyższe pod uwagę w pracy **H4** oceniono wpływu sulforafanu podawanego jednokrotnie, ale w wyższych dawkach, na próg pobudliwości drgawkowej w trzech mysich modelach drgawek padaczkowych, tj. w modelu i.v. PTZ, w teście MEST oraz w teście progu drgawek psychomotorycznych wywołanych prądem elektrycznym o częstotliwości 6 Hz. Ze względu na dość niespodziewane efekty uzyskane w ww. testach drgawkowych zbadano również wpływ sulforafanu na aktywność wybranych leków przeciwpadaczkowych oraz określono jego toksyczność celem zwiększenia bezpieczeństwa stosowania suplementów diety zawierających sulforafan przez pacjentów chorych na padaczkę i przyjmujących leki przeciwpadaczkowe.

Wbrew pierwotnym przypuszczeniom wyniki pierwszych doświadczeń pokazały, że sulforafan podawany i.p. w zakresie dawek 10–200 mg/kg nie podnosi progu pobudliwości drgawkowej w żadnym z zastosowanych modeli drgawkowych. Wręcz przeciwnie, sulforafan

podawany w dawce 200 mg/kg istotnie obniżył próg dla drgawek mioklonicznych i uogólnionych drgawek klonicznych w teście i.v. PTZ, a także próg drgawek psychomotorycznych w teście 6 Hz. Pozbawiony był natomiast działania w teście MEST. W kolejnych badaniach sulforafan nie wpływał na potencjał przeciwdrgawkowy klonazepam (w teście i.v. PTZ), topiramatu (w teście MES) oraz kwasu walproinowego i tiagabiny (w teście drgawek 6 Hz, 32 mA). Sulforafan w dawce 100 mg/kg obniżył natomiast wartość ED_{50} karbamazepiny w teście MES. Interakcje pomiędzy karbamazepiną a sulforafanem miały charakter farmakokinetyczny, ponieważ sulforafan podwyższał stężenie karbamazepiny zarówno w surowicy jak i mózgu myszy (oznaczenia HPLC zostały wykonane w ramach współpracy z prof. dr hab. Elżbietą Wyską z Zakładu Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Krakowie). Kombinacje sulforafanu z badanymi lekami przeciwpadaczkowymi nie wykazywały działań niepożądanych w postaci zaburzeń koordynacji ruchowej, zmian siły chwytu czy upośledzenia pamięci długotrwałej. Wyjątkiem była kombinacja sulforafanu z kwasem walproinowym, która zmniejszała siłę mięśni szkieletowych. W ramach pracy **H4** zbadano również toksyczność sulforafanu w kilku testach behawioralnych oraz jego wpływ na morfologię i wybrane parametry biochemiczne krwi. Uzyskane wyniki pokazały, że związek ten w sposób zależny od dawki wywołuje sedację, zaburzenia koordynacji ruchowej, osłabienie siły mięśni szkieletowych, a w najwyższych dawkach ataksję, hipotermię i śmierć. Dawka toksyczna TD_{50} sulforafanu została oszacowana na 191,6 mg/kg, a dawka letalna LD_{50} na 212,7 mg/kg. Sulforafan powodował również leukopenię (analiza hematologiczna i biochemiczna krwi została wykonana we współpracy z dr Edytą Kowalczyk-Vasilev z Instytutu Żywienia Zwierząt i Bromatologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie).

Podsumowując, wyniki badań opisanych w publikacji **H4** nie potwierdziły wcześniejszych doniesień o przeciwdrgawkowych właściwościach sulforafanu. Przeciwnie, pokazały, że w wysokich dawkach związek ten może działać prodrgawkowo i wchodzić w interakcje farmakokinetyczne z karbamazepiną, co wskazuje na konieczność zachowania ostrożności przy przyjmowaniu sulforafanu przez pacjentów z padaczką. Otrzymane wyniki pozwoliły również na ocenę toksyczności sulforafanu, która dotychczas nie była badana, choć związek ten jest przedmiotem licznych eksperymentów z udziałem zwierząt doświadczalnych, a przez ludzi stosowany jest jako suplement diety.

H5. Socała K, Nieoczym D, Pieróg M, Wyska E, Szafarz M, Doboszevska U, Wlaź P. (2018) Effect of tadalafil on seizure threshold and activity of antiepileptic drugs in three acute seizure tests in mice. *Neurotoxicity Research* 34(3):333-346

Badania pokazują, że nawet do 65% mężczyzn chorujących na padaczkę jest równocześnie dotkniętych problemem zaburzeń erekcji, co stwarza konieczność stosowania leków poprawiających funkcje seksualne [67, 68]. W terapii zaburzeń erekcji lekami pierwszego rzutu są inhibitory fosfodiesterazy typu 5 (PDE5): sildenafil i wardenafil (leki pierwszej generacji) oraz tadalafil (lek drugiej generacji). Tadalafil różni się od inhibitorów PDE5 pierwszej generacji dłuższym czasem działania, utrzymującym się przez minimum 24 godziny, oraz mniejszą liczbą działań niepożądanych [69, 70]. Mechanizm działania tych związków jest ściśle związany z komórkowym szlakiem NO/cGMP (tlenek azotu/cykliczny 3'5'-guanozynomonofosforan), który jest zaangażowany w regulację licznych procesów fizjologicznych [71]. Jest on również zaangażowany w patomechanizm wielu chorób, w tym padaczki. Dotychczas szeroko badany był jedynie wpływ sildenafilu na aktywność drgawkową. W zależności od użytego modelu doświadczalnego, lek ten wykazywał działanie zarówno pro- jak i przeciwdrgawkowe, a także wchodził w interakcje z niektórymi lekami przeciwpadaczkowymi [72-76]. Wpływ tadalafilu na pobudliwość drgawkową nie był wcześniej badany. Wydaje się jednak, że stosowanie tadalafilu u pacjentów z padaczką może nie być w pełni bezpieczne, ponieważ u osób przyjmujących ten lek zaobserwowano nieprawidłowości w zapisie EEG, świadczące o skłonności do drgawek padaczkowych [77]. Odnotowano również przypadek wystąpienia uogólnionych drgawek toniczno-klonicznych u młodego mężczyzny po zażyciu tadalafilu [78]. Tadalafil przyspieszał ponadto rozwój drgawek indukowanych tlenem hiperbarycznym u szczurów [79].

Celem poszerzenia wiedzy na temat wpływu tadalafilu na pobudliwość drgawkową w ramach badań opisanych w pracy **H5** oceniono wpływ tadalafilu na próg pobudliwości drgawkowej w trzech modelach drgawek padaczkowych u myszy, tj. w modelu i.v. PTZ, w teście MEST oraz w teście progu drgawek psychomotorycznych wywołanych prądem elektrycznym o częstotliwości 6 Hz. Zbadano również jego wpływ na aktywność wybranych leków przeciwpadaczkowych.

W pierwszym doświadczeniu oznaczono (za pomocą metody HPLC) stężenia tadalafilu w surowicy i mózgu myszy celem dokładniejszego określenia jego zdolności do przenikania

bariery krew-mózg oraz wyznaczenia czasu osiągnięcia maksymalnego stężenia. Otrzymane wyniki pokazały, że tadalafil przenika barierę krew-mózg, osiągając maksymalne stężenie zarówno w mózgu jak i surowicy po ok. 90 min od momentu podania (i.p.). W kolejnych eksperymentach tadalafil (w dawkach 5, 10 i 20 mg/kg) nie wpływał na próg uogólnionych drgawek klonicznych i tonicznego wyprostu kończyn przednich (w teście i.v. PTZ), próg tonicznego wyprostu kończyn tylnych (w teście MEST) oraz próg drgawek psychomotorycznych (w teście 6 Hz). Jednakże w teście i.v. PTZ tadalafil (w dawce 20 mg/kg) obniżał nieznacznie próg pobudliwości drgawkowej dla drgawek mioklonicznych. Tadalafil nie upośledzał koordynacji ruchowej oraz nie wpływał na siłę mięśni szkieletowych. Badany lek nie wpływał także na potencjał przeciwdrgawkowy karbamazepiny i topiramatu (w teście MES) oraz kwasu walproinowego i tiagabiny (w teście drgawek 6 Hz, 32 mA). W teście i.v. PTZ tadalafil (w dawce 20 mg/kg) nasilał natomiast przeciwdrgawkowe działanie klonazepamu wobec drgawek mioklonicznych i klonicznych, a osłabiał przeciwdrgawkowy efekt okskarbazepiny (również wobec drgawek mioklonicznych i klonicznych). Zaobserwowane interakcje miały raczej charakter farmakodynamiczny niż farmakokinetyczny, ponieważ tadalafil nie wpływał na stężenia klonazepamu i okskarbazepiny zarówno w surowicy jak i tkance mózgowej. Oznaczenia HPLC zostały wykonane w ramach współpracy z prof. dr hab. Elżbietą Wyską z Zakładu Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. Połączenia tadalafilu z badanymi lekami przeciwpadaczkowymi nie powodowały działań niepożądanych w postaci zaburzeń koordynacji ruchowej, zmian w sile chwytu czy upośledzenia pamięci długotrwałej.

Podsumowując, wyniki badań opisanych w publikacji **H5** sugerują, że tadalafil może zwiększać ryzyko wystąpienia drgawek mioklonicznych, jednak nie powinien wpływać na drgawki kloniczne i toniczne. Otrzymane wyniki pokazują, że tadalafil może powodować korzystne interakcje farmakodynamiczne z klonazepamem, ale należy unikać jego jednoczesnego podawania z okskarbazepiną.

H6. Socała K, Mogilski S, Pieróg M, Nieoczym D, Abram M, Szulczyk B, Lubelska A, Latacz G, Doboszevska U, Wlaź P, Kamiński K. (2018) KA-11, a novel pyrrolidine-2,5-dione derived broad-spectrum anticonvulsant: its antiepileptogenic, antinociceptive properties and *in vitro* characterization. *ACS Chemical Neuroscience* doi: 10.1021/acschemneuro.8b00476

Jedną ze strategii poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych jest otrzymywanie związków hybrydowych zawierających w swojej strukturze fragmenty chemiczne obecne w innych lekach przeciwdrgawkowych. Przykładem takiego związku jest KA-11, czyli 1-(1-okso-1-{4-[3-(trifluorometylo)fenylo]piperazyn-1-ylo}propan-2-ylo)pirolidyno-2,5-dion, który został zaprojektowany i zsyntetyzowany w Zakładzie Chemii Leków, Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie [80]. KA-11 zawiera fragmenty chemiczne trzech powszechnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych (etosuksymidu, lakozamidu oraz lewetiracetamu), dzięki czemu związek ten wykazuje szerokie spektrum działania przeciwdrgawkowego, hamując drgawki w teście MES, s.c. PTZ oraz 6 Hz (32 mA), przy jednoczesnym korzystnym profilu bezpieczeństwa. Wymienione modele zwierzęce to metody, w których drgawki indukowane są jednorazowo. Przy ich użyciu można stwierdzić czy dana substancja jest w stanie zahamować wystąpienie drgawek. Testy te nie odzwierciedlają jednak zjawisk towarzyszących rozwojowi padaczki, czyli tzw. epileptogenezie. Nowoczesne leki przeciwpadaczkowe powinny odznaczać się nie tylko zdolnością redukcji napadów drgawkowych, ale również powinny hamować proces rozwijania się padaczki.

W związku z powyższym w ramach badań opisanych w pracy **H6** przeprowadzono dalszą charakterystykę potencjału przeciwpadaczkowego związku KA-11 oceniając jego wpływ na proces epileptogenezy w modelu drgawek rozniecanych (tzw. kindling) indukowanych wielokrotnym podawaniem PTZ u myszy. Dodatkowo oceniono niektóre parametry behawioralne zwierząt poddanych procedurze kindlingu oraz zmiany w progu pobudliwości drgawkowej (w teście i.v. PTZ). Przeprowadzono również szereg innych badań *in vivo* i *in vitro* celem lepszego poznania profilu farmakologicznego oraz toksyczności KA-11.

Otrzymane wyniki pokazały, że KA-11 podawany wielokrotnie w dawkach 25, 50 i 100 mg/kg (i.p.) spowalnia proces epileptogenezy w modelu kindlingu PTZ. Po zakończonym kindlingu i zaprzestaniu podawania KA-11 oceniono zmiany w progu pobudliwości drgawkowej w teście i.v. PTZ. Okazało się, że u zwierząt przyjmujących KA-11 w najwyższej

dawce (100 mg/kg) doszło do obniżenia progu dla drgawek mioklonicznych i klonicznych (po 48 h od ostatniego podania KA-11), co sugeruje efekt odstawienny. Jest to dość niespodziewany rezultat, ponieważ badania radioreceptowe (wykonane komercyjnie w laboratoriach Cerep, Francja) wykazały, że związek ten nie wiąże się z podjednostkami $\alpha 1$, $\beta 2$ i $\gamma 2$ kompleksu receptora GABA_A. Celem porównania oceniono również wpływ KA-11 podawanego jednorazowo na próg drgawkowy w modelu i.v. PTZ u zwierząt, które nie były poddane procedurze kindlingu. Uzyskane rezultaty pokazały, że KA-11 wyraźnie podnosi próg pobudliwości drgawkowej dla wszystkich rodzajów drgawek ocenianych w teście i.v. PTZ. Następnym kindlingu PTZ (podobnie jak padaczki u ludzi) są często zachowania prodepresyjne oraz nasilony lęk, dlatego oceniono również zachowanie zwierząt poddanych procedurze rozniecania i przyjmujących KA-11 w teście wymuszonego pływania (ocena działania przeciwdepresyjnego) oraz w teście podniesionego labiryntu krzyżowego (ocena działania przeciwlękowego), a wyniki zweryfikowano w teście na aktywność ruchową. Co ciekawe, KA-11 znosił indukowane kindlingiem wydłużenie czasu bezruchu w teście wymuszonego pływania, co sugeruje jego działanie przeciwdepresyjne. Kolejne badania (wykonane we współpracy z dr. Szczepanem Mogilskim z Zakładu Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie) wykazały, że związek ten posiada działanie przeciwbólowe w modelu bólu tonicznego i neuropatycznego oraz nie zaburza koordynacji ruchowej. KA-11 może jednak lekko upośledzać pamięć długotrwałą, ale tylko w wysokiej dawce. W badaniach *in vitro* (wykonanych we współpracy z Katedrą Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie) nie stwierdzono wyraźnego hepatotoksycznego działania KA-11 oraz wpływu na funkcję izoenzymu CYP2D6. Mechanizm działania KA-11 może być związany z jego zdolnością do hamowania potencjałozależnych prądów jonowych sodowych (badania wykonane we współpracy z dr. Bartłomiejem Szulczykiem z Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego) i/lub jego zdolnością do wiązania się z kanałami wapniowymi typu L (Cerep, Francja).

Podsumowując, wyniki badań opisanych w publikacji **H6** sugerują, że nowa hybrydowa pochodna piperidyno-2,5-dionu wykazuje pozytywny wpływ na próg pobudliwości drgawkowej dla różnych rodzajów drgawek ocenianych w teście i.v. PTZ oraz, co jest niezwykle istotne, związek ten może posiadać zdolność do hamowania procesu

epileptogenezy. KA-11 posiada ponadto szereg innych właściwości (np. przeciwbólowe czy przeciwdepresyjne), które sprawiają, że może stać się on dobrym kandydatem do dalszych badań nad nowymi lekami przeciwpadaczkowymi o szerokim spektrum działania.

Wnioski i podsumowanie:

Wyniki doświadczeń opisanych w przedstawionym do postępowania habilitacyjnego cyklu prac, oceniającym wpływ wybranych substancji na aktywność drgawkową, pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

- I. Wodny ekstrakt z grzybni *G. lucidum* pozbawiony jest wyraźnego wpływu na pobudliwość drgawkową u myszy, co nie potwierdza wcześniejszych doniesień o jego potencjalnych właściwościach przeciwdrgawkowych.
- II. α -Spinasterol (selektywny antagonist receptor TRPV1 pochodzenia roślinnego) oraz SB 334867 (selektywny antagonist receptor OX1) podnoszą próg pobudliwości drgawkowej dla różnych rodzajów drgawek, co wskazuje na ich ewentualny potencjał przeciwdrgawkowy. Związki te wydają się być dobrymi kandydatami do badań nad rolą receptora TRPV1 i receptora oreksynowego OX1 w patomechanizmie napadów padaczkowych. Można je również traktować jako struktury modelowe w procesie poszukiwania leków przeciwpadaczkowych o nowych mechanizmach działania.
- III. Sulforafan (aktywator szlaku Nrf2-ARE pochodzenia roślinnego), który był uważany za związek o niskiej toksyczności, obniża próg pobudliwości drgawkowej i wchodzi w interakcje farmakokinetyczne z powszechnie stosowanym lekiem przeciwpadaczkowym – karbamazepiną. Przeprowadzone doświadczenie pokazało jednoznacznie, że toksyczność sulforafanu jest dużo większa niż podaje to dostępna literatura. Należy pamiętać, że sulforafan stosowany jest jako suplement diety w profilaktyce wielu schorzeń i może być przyjmowany przez osoby chorujące na padaczkę. Niestety wśród społeczeństwa panuje często błędne przekonanie, że suplementy diety i preparaty ziołowe nie wywołują żadnych działań niepożądanych. Badania naukowe pokazują jednak, że istnieje realne ryzyko obniżania progu drgawkowego przez preparaty zawierające np. miłorząb japoński, dziurawiec czy bylicę piołun [81, 82]. Wydaje się, że również w przypadku

suplementów diety zawierających sulforafan może być konieczne zachowanie większej ostrożności przy ich stosowaniu u pacjentów z padaczką, w tym przyjmujących karbamazepinę.

- IV. Tadalafil (selektywny inhibitor PDE5), który stosowany jest w leczeniu zaburzeń erekcji u mężczyzn, nieznacznie obniża próg pobudliwości drgawkowej, ale tylko dla drgawek mioklonicznych. Sugeruje to, że lek ten może zwiększać ryzyko wystąpienia drgawek mioklonicznych. Tadalafil może powodować korzystne interakcje farmakodynamiczne z klonazepamem, ale należy raczej unikać jego jednoczesnego podawania z okskarbazepiną, ponieważ może osłabiać jej działanie. Konieczne są dalsze badania pozwalające oszacować korzyści lub możliwe ryzyko wynikające ze stosowania tadalafilu u pacjentów z padaczką i przyjmujących leki przeciwpadaczkowe.
- V. KA-11 (nowa hybrydowa pochodna piperidyno-2,5-dionu), oprócz zdolności do podnoszenia progu pobudliwości drgawkowej, hamuje proces epileptogenezy, co jest niezwykle istotne ze względu na fakt, że nowoczesne leki przeciwpadaczkowe powinny odznaczać się nie tylko zdolnością do redukcji napadów drgawkowych, ale również powinny hamować proces rozwijania się padaczki. Wydaje się, że KA-11 może stanowić strukturę modelową w procesie poszukiwania leków przeciwpadaczkowych o wysokim profilu bezpieczeństwa i szerokim spektrum działania, w tym o działaniu antyepileptogennym.

Oczywiste jest, że wyniki badań na zwierzętach nie mogą być bezpośrednio przekładane na praktykę kliniczną. Jednak badanie substancji o potencjalnym wpływie na pobudliwość drgawkową u zwierząt doświadczalnych stanowi obecnie kluczowy etap w procesie poszukiwania mechanizmów leżących u podstaw różnych rodzajów napadów padaczkowych, a wskazanie związków o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym i korzystnym profilu bezpieczeństwa ma ogromne znaczenie w procesie opracowywania nowych opcji terapeutycznych. Identyfikacja związków o ewentualnym działaniu prodrgawkowym jest z kolei niezwykle istotna dla oceny bezpieczeństwa ich stosowania przez pacjentów z padaczką, gdyż mogą one zwiększać prawdopodobieństwo obniżenia progu drgawkowego i sprzyjać napadom.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

W latach 2001–2006 byłam studentką studiów biologicznych na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W trakcie badań prowadzonych w ramach pracowni specjalizacyjnej i magisterskiej w Zakładzie Biochemii zaznajomiłam się z podstawowymi technikami biochemicznymi i wykonywałam prace badawcze w ramach działalności Studenckiego Koła Naukowego Biochemików. Pracę magisterską pt. „Analiza proteolizy powierzchniowej owocników grzybów wielkoowocnikowych pod kątem skriningu gatunkowego, rytmu rocznego oraz strategii wzrostu grzyba”, wykonaną pod kierunkiem prof. dr. hab. Krzysztofa Grzywnowicza, obroniłam w czerwcu 2006 roku. Po zakończeniu studiów otrzymałam nagrodę im. dr Anny Siedleckiej dla najlepszego absolwenta w roku 2006 na kierunku biologia za wybitne wyniki w nauce oraz działalność naukową i organizacyjną podczas studiów.

W październiku 2006 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Zakładzie Fizjologii Zwierząt na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie jest to Wydział Biologii i Biotechnologii) Uniwersytetu Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie, gdzie pracuję po dzień dzisiejszy. Moje zainteresowania naukowo-badawcze skoncentrowały się na poszukiwaniu mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie wybranych zaburzeń neurologicznych i psychiatrycznych (głównie padaczki i depresji) oraz nowych sposobów ich leczenia. W ramach współpracy z dr Dorotą Nieoczym z Zakładu Fizjologii Zwierząt zaangażowałam się w doświadczenia badające wpływ sildenafilu (Viagra®), selektywnego inhibitora PDE5, na aktywność drgawkową oraz działanie leków przeciwpadaczkowych. Co ciekawe, wyniki pierwszych doświadczeń wykazały brak działania sildenafilu w modelu drgawek kokainowych u myszy, prodrgawkowe właściwości sildenafilu w teście i.v. PTZ u myszy i przeciwdrgawkowe działanie sildenafilu w teście drgawek rozniecanych z ciała migdałowatego u szczurów. Otrzymane wyniki zostały opisane w publikacjach **P1** i **P2**. Doświadczenia te były następnie kontynuowane w ramach grantu badawczego finansowanego przez Komitet Badań Naukowych pt. „Wpływ sildenafilu na działanie klasycznych i nowych leków przeciwpadaczkowych w modelach napadów padaczkowych

u myszy. Badania farmakodynamiczne i farmakokinetyczne” (kierownik: prof. dr hab. Piotr Wlaź), realizowanego w latach 2008–2011. Efektem badań prowadzonych w ramach niniejszego grantu były publikacje **D3** i **D6**, które ukazały się już po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora nauk biologicznych.

Przed uzyskaniem stopnia doktora brałam również udział w badaniach nad wpływem sarkozyny (selektywnego inhibitora transportera glicyny GlyT1) na próg pobudliwości drgawkowej u myszy oraz w badaniach dotyczących przeciwpsychotycznego działania tofizopamu, 2,3-benzodiazepiny, u myszy. Badania te były prowadzone w ramach współpracy z prof. Chrisem Rundfeldtem (z Zakładu Farmakologii, Toksykologii i Farmacji Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej w Hanowerze, Niemcy). Wyniki powyższych badań zostały opisane w publikacjach **P3** i **P4**. We współpracy z prof. dr hab. Ewą Poleszak z Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie badałam natomiast rolę receptorów NMDA w przeciwlękowych efektach działania chlordiazepoksydu u myszy (publikacja **P5**). Współpracowałam również z dr. hab. Mirosławem Czuczwarem z II Kliniki Anestezjologii i Intensywnej Terapii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie przy realizacji projektu Iuventus Plus finansowanego przez MNiSW pt. „Wpływ hamowania neurogenezy we wczesnym okresie życia na epileptogenezę i zjawisko lekooporności u szczurów”, która zaowocowała czterema doniesieniami zjazdowymi. Nawiązałam także współpracę z prof. dr. hab. Maciejem Gąsiorem (z Zakładu Farmakologii i Fizjologii, Kolegium Medycznego Uniwersytetu Drexel w Filadelfii, USA), w ramach której wykazaliśmy brak wpływu kwasu klawulanowego (inhibitora β -laktamaz) na aktywność drgawkową u myszy (publikacja **D5**) oraz oceniliśmy działanie kwasu kaprylowego (głównego składnika diety ketogennej opartej na trójglicerydach średniołańcuchowych) w mysich modelach drgawek padaczkowych (publikacja **D1**).

Równolegle do opisanych powyżej prac prowadziłam badania nad wpływem sildenafilu na aktywność leków przeciwdepresyjnych, których wyniki stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej. Badania te zostały podjęte ze względu na dość szeroko rozpowszechniony problem współwystępowania depresji i zaburzeń erekcji oraz brak rzetelnych danych na temat wpływu sildenafilu na patomechanizm depresji i potencjał terapeutyczny leków przeciwdepresyjnych. Część z tych badań została sfinansowana z Grantu Zespołowego Prorektora UMCS ds. Nauki pt. „Wpływ sildenafilu na działanie

wybranych leków przeciwdepresyjnych u myszy”. Uzyskane wyniki pokazały, że sildenafil może posiadać właściwości przeciwdepresyjne w teście wymuszonego pływania u myszy, ale są one widoczne dopiero po zablokowaniu muskarynowych receptorów cholinergicznym, gdyż lek ten wykazuje jednoczesną zdolność do nasilania neuroprzeżywania cholinergicznego. Sildenafil wywierał ponadto różnoraki wpływ na aktywność leków przeciwdepresyjnych, który uzależniony był od mechanizmu działania danego leku. Związek ten nasilał m.in. aktywność amitriptyliny, wenlafaksyny, bupropionu, mianseryny i tianeptyny w teście wymuszonego pływania, a osłabiał przeciwdepresyjne działanie paroksetyny i magnezu. Połączenia sildenafilu z niektórymi lekami (wenlafaksyną, bupropionem i tianeptyną) może prowadzić do interakcji farmakokinetycznych, a połączenia z magnezem do hipermagnezacji.

Pracę doktorską pt. „Wpływ sildenafilu na aktywność wybranych leków przeciwdepresyjnych w teście wymuszonego pływania u myszy”, wykonaną pod kierunkiem prof. dr. hab. Piotra Wlazia, obroniłam w 2011 roku. Praca ta została wyróżniona decyzją Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Wyniki doświadczeń realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej zostały opublikowane po jej obronie (publikacje **D2, D4, D7–D9**).

Podsumowanie dorobku naukowego przed otrzymaniem stopnia doktora:

Liczba publikacji znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*: 5

Łączny *Impact Factor*: 12,413

Łączna liczba punktów MNiSW: 136

5.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych kontynuowałam badania farmakologiczne w Zakładzie Fizjologii Zwierząt UMCS w dalszym ciągu koncentrując się na poszukiwaniu związków o aktywności ośrodkowej (głównie przeciwdrgawkowej i przeciwdepresyjnej) oraz ocenie ich interakcji z innymi lekami.

W 2012 roku otrzymałam stypendium badawcze Niemieckiej Centrali Wymiany Akademickiej (DAAD), dzięki któremu odbyłam 5-miesięczny staż w Zakładzie Farmakologii, Toksykologii i Farmacji Uniwersytetu Medycyny Weterynaryjnej w Hanowerze (Niemcy) pod opieką prof. Wolfganga Löschera i dr Claudii Brandt. W ramach stażu byłam zaangażowana w realizację projektu pt. „Modelling electroconvulsive therapy (ECT) in rats: Investigation of the influence of different stimulation paradigms on the therapeutic effect of ECT and of resistance mechanisms in ECT-nonresponders”, który zaowocował publikacją **D13**. W trakcie stażu doskonaliłam również swój warsztat badawczy z zakresu zwierzęcych modeli drgawek i padaczki.

W latach 2012–2013 byłam wykonawcą projektu Iuventus Plus finansowanego przez MNiSW pt. „Wpływ sildenafilu na aktywność drgawkową oraz działanie wybranych leków przeciwpadaczkowych w modelu drgawek psychomotorycznych wywoływanych prądem elektrycznym o częstotliwości 6 Hz u myszy” (kierownik projektu: dr Dorota Nieoczym). Wyniki otrzymane w trakcie realizacji ww. projektu pokazały, że sildenafil wykazuje silny efekt przeciwdrgawkowy w teście drgawek psychomotorycznych i nasila działanie wszystkich badanych leków przeciwpadaczkowych (praca **D11**).

Po uzyskaniu stopnia doktora w 2011 roku rozpoczęłam również współpracę z prof. dr. hab. Jakubem Fichną z Zakładu Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi badając wpływ nowych selektywnych antagonistów receptora opioidowego μ na próg drgawkowy u myszy (publikacja **D10**), a w późniejszym czasie oceniając również działanie nowych agonistów receptora melatoninowego oraz melatoniny w zwierzęcych modelach drgawek (publikacja **D19**). Oceniony został także neurofarmakologiczny profil działania wodnego wyciągu z *Calea zacatechichi* u myszy (publikacja **D18**). W ramach dalszej współpracy z prof. dr hab. Ewą Poleszak brałam natomiast udział w badaniach oceniających działanie sperminy, będącej ligandem receptorów glutaminianergicznych typu NMDA, w teście wymuszonego pływania u myszy, co zostało opisane w publikacji **D12**. Kontynuowałam również współpracę z prof. dr. hab. Maciejem Gąsiorem nad dietą ketogenną, a jej efektem była publikacja **D15** opisująca wpływ kwasu dekanowego, kolejnego składnika diety ketogennej opartej na trójglicerydach średniołańcuchowych, na aktywność drgawkową. Celem poszerzenia wiedzy na temat mechanizmu przeciwdrgawkowego działania kwasu kaprylowego w modelu drgawek psychomotorycznych

przeprowadziłam doświadczenia, w których wykazałam, że w mechanizm ten mogą być zaangażowane m.in. receptory adenozynowe A_1 i A_{2A} . Badania te pokazały również, że nagły wzrost poziomu glukozy we krwi znosi przeciwdrgawkowe działanie kwasu kaprylowego (publikacja **D16**).

W latach 2015–2016 kontynuowałam badania nad wpływem sildenafilu na patomechanizm depresji i skuteczność terapii przeciwdepresyjnej, pełniąc funkcję kierownika projektu luventus Plus finansowanego przez MNiSW pt. „Ocena przeciwdepresyjnego działania sildenafilu (selektywnego inhibitora fosfodiesterazy 5) i jego wpływu na terapię przeciwdepresyjną u myszy”. Otrzymane wyniki pokazały, że sildenafil podawany wielokrotnie wykazuje słabe działanie przeciwdepresyjne w teście wymuszonego pływania u myszy. Sildenafil podawany jednokrotnie, lecz nie przewlekle, odwracał wywołane rezerpiną lub stresem unieruchomienia wydłużenie czasu trwania bezruchu w tym teście. Jednorazowe podanie sildenafilu wywołało ponadto wyraźny wzrost poziomu kortykosteronu we krwi zwierząt poddanych stresowi unieruchomienia jak i zwierząt, które nie były poddane procedurze unieruchomienia. Sildenafil nasilał aktywność wszystkich badanych leków przeciwdepresyjnych w teście wymuszonego pływania u myszy. Otrzymane wyniki sugerują, że interakcje zachodzące pomiędzy sildenafiliem a sertralina, trazodonem i maprotylina mają charakter interakcji farmakodynamicznych. Nasilona aktywność citalopramu, fluwoksaminy i agomelatyny może być natomiast wynikiem interakcji farmakokinetycznych z sildenafiliem. Co ciekawe, wielokrotne podania sildenafilu osłabiły przeciwdepresyjne działanie terapii elektrowstrząsowej u myszy. Powyższe wyniki zostały opisane w publikacjach **D20** i **D21**.

Wykonałam ponadto badania oceniające potencjał przeciwdepresyjny i przeciwłękowy α -spinasterolu – selektywnego antagonisty receptora TRPV1. Otrzymane rezultaty (opisane w pracy **D17**) pokazały m.in., że związek ten posiada działanie przeciwdepresyjne w teście wymuszonego pływania u myszy, ale pozbawiony jest działania przeciwłękowego w teście podniesionego labiryntu krzyżowego i teście wyboru jasnego/ciemnego pomieszczenia.

W latach 2014–2018 brałam udział w badaniach zaplanowanych przez dr Dorotę Nieoczym z Zakładu Fizjologii Zwierząt, które miały na celu ocenę potencjału

przeciwdrgawkowego rutyny i kwercetyny – flawonoidów roślinnych (publikacja **D14**), błękitu brylantowego – selektywnego antagonisty receptora P2X7 (publikacja **D22**) oraz kwasu ursulowego – związku z grupy terpenoidów (publikacja **D24**), a także w badaniach mających na celu określenie mechanizmów odpowiedzialnych za przeciwdrgawkowe efekty działania sildenafilu w teście drgawek psychomotorycznych u myszy (publikacja **D25**).

W 2017 roku nawiązałam współpracę z dr hab. Karoliną Pytką z Zakładu Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, w ramach której wykonywałam eksperymenty, które pokazały, że HBK-14 i HBK-15, nowi antagoniści receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}, 5-HT₇ and 5-HT₃, wykazują działanie przeciwdrgawkowe w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych, co zostało opisane w publikacji **H23**.

Pod koniec 2017 roku otrzymałam finansowanie zadania badawczego w konkursie Miniatura 1 ogłoszonym przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Wpływ kannabidiolu na aktywność nowych leków przeciwpadaczkowych w modelach drgawek indukowanych elektrycznie u myszy”. W roku 2017 roku rozpoczęłam również współpracę z dr. hab. Krzysztofem Kamińskim z Zakładu Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. W ramach nawiązanej współpracy wykonywałam doświadczenia mające na celu ocenę wpływu 2 wybranych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu na zjawisko epileptogenezy, próg drgawkowy i inne parametry behawioralne u myszy. Część otrzymanych wyników została opisana w publikacji **H6**. Od 2018 roku jestem ponadto wykonawcą w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Opus 14 pt. „Nowi antagoniści receptora waniloidowego typu 1 (TRPV1) w poszukiwaniu substancji o szerokim spektrum aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwbólowej w badaniach przedklinicznych”, którego kierownikiem jest dr hab. Krzysztof Kamiński.

Za swoją działalność naukowo-badawczą byłam 6-krotnie nagradzana Nagrodą Zespołową Rektora Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, a w 2013 roku otrzymałam stypendium START dla wybitnych młodych z Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

Podsumowanie dorobku naukowego po uzyskaniu stopnia doktora (wyłączając publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe):

Liczba publikacji znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*: 25

łączny *Impact Factor*: 79,600

łączna liczba punktów MNiSW: 725

6. Podsumowanie całego dorobku naukowego

łączna liczba publikacji znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*: **36**

łączny *Impact Factor*: **109,906**

łączna liczba punktów MNiSW: **1031**

Liczba cytowań publikacji według bazy *Web of Science*: **271**

Liczba cytowań publikacji bez autocytowań według bazy *Web of Science*: **205**

Indeks Hirscha według bazy *Web of Science*: **10**

Liczba komunikatów zjazdowych: **31**, w tym:

- z konferencji krajowych: **9**
- z konferencji międzynarodowych: **22**

Liczba projektów badawczych: **7**, w tym:

- kierownik projektu: **2**
- wykonawca: **5**

Piśmiennictwo:

1. Nadkarni S, LaJoie J, Devinsky O (2005) Current treatments of epilepsy. *Neurology* 64:S2-11
2. Lasoń W, Chlebicka M, Rejdak K (2013) Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol Rep* 65:787-801
3. Nickels K (2017) How have we come this far? Epilepsy classification through the ages. *Epilepsy Curr* 17:229-231
4. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshe SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM (2017) ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58:512-521
5. Brodie MJ, Zuberi SM, Scheffer IE, Fisher RS (2018) The 2017 ILAE classification of seizure types and the epilepsies: what do people with epilepsy and their caregivers need to know? *Epileptic Disord* 20:77-87
6. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshe SL, Peltola J, Roulet PE, Scheffer IE, Zuberi SM (2017) Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58:522-530
7. Jefferys JG (2010) Advances in understanding basic mechanisms of epilepsy and seizures. *Seizure* 19:638-646
8. Stafstrom CE (2006) Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:983-1004
9. Lasoń W, Dudra-Jastrzębska M, Rejdak K, Czuczwar SJ (2011) Basic mechanisms of antiepileptic drugs and their pharmacokinetic/pharmacodynamic interactions: an update. *Pharmacol Rep* 63:271-292
10. Rogawski MA, Löscher W (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 5:553-564
11. Nevitt SJ, Sudell M, Weston J, Tudur SC, Marson AG (2017) Antiepileptic drug monotherapy for epilepsy: a network meta-analysis of individual participant data. *Cochrane Database Syst Rev* 12:CD011412
12. St Louis EK, Rosenfeld WE, Bramley T (2009) Antiepileptic drug monotherapy: the initial approach in epilepsy management. *Curr Neuropharmacol* 7:77-82
13. Giussani G, Bianchi E, Canelli V, Erba G, Franchi C, Nobili A, Sander JW, Beghi E (2017) Antiepileptic drug discontinuation by people with epilepsy in the general population. *Epilepsia* 58:1524-1532
14. Johannessen SI, Landmark CJ (2010) Antiepileptic drug interactions – principles and clinical implications. *Curr Neuropharmacol* 8:254-267
15. Löscher W 2012. Strategies for antiepileptogenesis: Antiepileptic drugs versus novel approaches evaluated in post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. W: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen DM, Delgado-Escueta AV (red.), *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet], Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (USA).
16. Rai D, Kerr MP, McManus S, Jordanova V, Lewis G, Brugha TS (2012) Epilepsy and psychiatric comorbidity: a nationally representative population-based study. *Epilepsia* 53:1095-1103
17. Donner EJ (2011) Explaining the unexplained; expecting the unexpected: where are we with sudden unexpected death in epilepsy? *Epilepsy Curr* 11:45-49
18. Holmes GL (2015) Cognitive impairment in epilepsy: the role of network abnormalities. *Epileptic Disord* 17:101-116
19. Meador KJ (2002) Cognitive outcomes and predictive factors in epilepsy. *Neurology* 58:S21-S26
20. Löscher W (2009) Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *Eur J Pharmacol* 610:1-11
21. White HS (1998) Chemoconvulsants. W: Peterson, S.L., and Albertson, T.E. (red.), *Neuropharmacology methods in epilepsy research*, CRC Press, Boca Raton FL, str. 27-40
22. Löscher W, Schmidt D (2011) Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia* 52:657-678
23. Barton ME, Klein BD, Wolf HH, White HS (2001) Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Res* 47:217-227

24. Löscher W (2016) Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. *Epilepsy Res* 126:157-84
25. Gilbert ME, Goodman JH (2006) Chemical kindling. W: *Models of seizures and epilepsy*, Elsevier Academic Press, str. 79-393
26. Klitgaard H, Matagne A, Schachter SC, White HS (2008) Animal and translational models of the epilepsies. W: *Animal and Translational Models for CNS Drug Discovery*, Elsevier Academic Press, str. 311-335
27. Wachtel-Galor S, Yuen J, Buswell JA, Benzie IFF (2011) *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi): a medicinal mushroom. W: Benzie IFF, Wachtel-Galor S (red.), *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*, Taylor and Francis Group, LLC
28. Jin X, Ruiz BJ, Sze DM, Chan GC (2012) *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom) for cancer treatment. *Cochrane Database Syst Rev* 6:CD007731
29. Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L (2007) *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnol Annu Rev* 13:265-301
30. Boh B (2012) *Ganoderma lucidum*: a potential for biotechnological production of anti-cancer and immunomodulatory drugs. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 8:255-87
31. Shiao MS (2003) Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *Chem Rec* 3:172-180
32. Zhao HB, Lin SQ, Liu JH, Lin ZB (2004) Polysaccharide extract isolated from *Ganoderma lucidum* protects rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury. *J Pharmacol Sci* 95:294-298
33. Zhou Y, Qu ZQ, Zeng YS, Lin YK, Li Y, Chung P, Wong R, Hagg U (2012) Neuroprotective effect of preadministration with *Ganoderma lucidum* spore on rat hippocampus. *Exp Toxicol Pathol* 64:673-680
34. Zhou ZY, Tang YP, Xiang J, Wua P, Jin HM, Wang Z, Mori M, Cai DF (2010) Neuroprotective effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cerebral ischemic injury in rats. *J Ethnopharmacol* 19:154-164
35. Aguirre Moreno AC, Campos P, V, Villeda HJ, Leon R, I, Montiel AE (2011) *Ganoderma lucidum* reduces kainic acid-induced hippocampal neuronal damage via inflammatory cytokines and glial fibrillary acid protein expression. *Proc West Pharmacol Soc* 54:78-79
36. Eells JB, Clough RW, Browning RA, Jobe PC (2004) Comparative fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentylenetetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats. *Neuroscience* 123:279-292
37. Nilius B, Appendino G (2013) Spices: the savory and beneficial science of pungency. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 164:1-76
38. Borges FR, Silva MD, Cordova MM, Schambach TR, Pizzolatti MG, Santos AR (2014) Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid alpha-spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. *J Ethnopharmacol* 151:144-150
39. Jeon GC, Park MS, Yoon DY, Shin CH, Sin HS, Um SJ (2005) Antitumor activity of spinasterol isolated from *Pueraria* roots. *Exp Mol Med* 37:111-120
40. Jeong GS, Li B, Lee DS, Kim KH, Lee IK, Lee KR, Kim YC (2010) Cytoprotective and anti-inflammatory effects of spinasterol via the induction of heme oxygenase-1 in murine hippocampal and microglial cell lines. *Int Immunopharmacol* 10:1587-1594
41. Klein-Junior LC, Meira NA, Bresolin TM, Cechinel-Filho V, Quintao NL (2012) Antihyperalgesic activity of the methanol extract and some constituents obtained from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 111:145-153
42. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 6:357-372
43. Vriens J, Appendino G, Nilius B (2009) Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* 75:1262-1279
44. Gonzalez-Reyes LE, Ladas TP, Chiang CC, Durand DM (2013) TRPV1 antagonist capsazepine suppresses 4-AP-induced epileptiform activity in vitro and electrographic seizures in vivo. *Exp Neurol* 250:321-32

45. Shirazi M, Izadi M, Amin M, Rezvani ME, Roohbakhsh A, Shamsizadeh A (2014) Involvement of central TRPV1 receptors in pentylenetetrazole and amygdala-induced kindling in male rats. *Neurol Sci* 35(8):1235-41
46. Trevisan G, Rossato MF, Walker CI, Klafke JZ, Rosa F, Oliveira SM, Tonello R, Guerra GP, Boligon AA, Zanoni RB, Athayde ML, Ferreira J (2012) Identification of the plant steroid alpha-spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *J Pharmacol Exp Ther* 343:258-269
47. Kukkonen JP (2013) Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012. *Am J Physiol Cell Physiol* 304:C2-32
48. Scammell TE, Winrow CJ (2011) Orexin receptors: pharmacology and therapeutic opportunities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51:243-66
49. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996-10015
50. Foldvary-Schaefer N, Grigg-Damberger M (2006) Sleep and epilepsy: what we know, don't know, and need to know. *J Clin Neurophysiol* 23:4-20
51. Ni LY, Zhu MJ, Song Y, Liu XM, Tang JY (2014) Pentylenetetrazol-induced seizures are exacerbated by sleep deprivation through orexin receptor-mediated hippocampal cell proliferation. *Neurol Sci* 35:245-252
52. Erken HA, Erken G, Genc O, Kortunay S, Sahiner M, Turgut G, Turgut S (2012) Orexins cause epileptic activity. *Peptides* 37:161-164
53. Kortunay S, Erken HA, Erken G, Genc O, Sahiner M, Turgut S, Turgut G (2012) Orexins increase penicillin-induced epileptic activity. *Peptides* 34:419-422
54. Goudarzi E, Elahdadi SM, Lashkarbolouki T, Goudarzi I (2015) Hippocampal orexin receptors inactivation reduces PTZ induced seizures of male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 130:77-83
55. Portelli J, Coppens J, Demuyser T, Smolders I (2015) Des-acyl ghrelin attenuates pilocarpine-induced limbic seizures via the ghrelin receptor and not the orexin pathway. *Neuropeptides* 51:1-7
56. Kaciński M, Budziszewska B, Lasoń W, Zając A, Skowronek-Bała B, Leśkiewicz M, Kubik A, Basta-Kaim A (2012) Level of S100B protein, neuron specific enolase, orexin A, adiponectin and insulin-like growth factor in serum of pediatric patients suffering from sleep disorders with or without epilepsy. *Pharmacol Rep* 64:1427-1433
57. Rejdak K, Papuć E, Grieb P, Stelmasiak Z (2009) Decreased cerebrospinal fluid hypocretin-1 (orexin A) in patients after repetitive generalized tonic-clonic seizures. *Epilepsia* 50:1641-1644
58. Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS (2016) Sulforaphane and other nutrigenomic Nrf2 activators: Can the clinician's expectation be matched by the reality? *Oxid Med Cell Longev* 2016:7857186
59. Brown RH, Reynolds C, Brooker A, Talalay P, Fahey JW (2015) Sulforaphane improves the bronchoprotective response in asthmatics through Nrf2-mediated gene pathways. *Respir Res* 16:106
60. Singh K, Connors SL, Macklin EA, Smith KD, Fahey JW, Talalay P, Zimmerman AW (2014) Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proc Natl Acad Sci USA* 111:15550-5
61. Wu S, Gao Q, Zhao P, Gao Y, Xi Y, Wang X, Liang Y, Shi H, Ma Y (2016) Sulforaphane produces antidepressant- and anxiolytic-like effects in adult mice. *Behav Brain Res* 301:55-62
62. Jaźwa A, Rojo AI, Innamorato NG, Hesse M, Fernandez-Ruiz J, Cuadrado A (2011) Pharmacological targeting of the transcription factor Nrf2 at the basal ganglia provides disease modifying therapy for experimental parkinsonism. *Antioxid Redox Signal* 14:2347-2360
63. Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S (2002) Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 62:5196-5203
64. Huang Y, Li W, Su ZY, Kong AN (2015) The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *J Nutr Biochem* 26:1401-1413
65. Wang W, Wu Y, Zhang G, Fang H, Wang H, Zang H, Xie T, Wang W (2014) Activation of Nrf2-ARE signal pathway protects the brain from damage induced by epileptic seizure. *Brain Res* 1544:54-61
66. Carrasco-Pozo C, Tan KN, Borges K (2015) Sulforaphane is anticonvulsant and improves mitochondrial function. *J Neurochem* 135:932-942

67. Hamed SA, Ahmad HK, Youssef AH, Metwaly NA-H, Hassan MM, Mohamad HO (2013) Erectile function in men with epilepsy: relationship to psychosocial-, hormonal-, epilepsy- and antiepileptic drugs- related variables. *J Neurol Neurosci* 4(2):5
68. Vieira FC, Ronsoni MF, Hohl A, Claudino LS, Diaz AP, Schwarzbald ML, Guarneri R, Nunes JC, Lin K, Walz R (2015) How predictable is the erectile function of patients with epilepsy? *Epilepsy Behav* 47:61-5
69. Coward RM, Carson CC (2008) Tadalafil in the treatment of erectile dysfunction. *Ther Clin Risk Manag* 4:1315-1330
70. Huang SA, Lie JD (2013) Phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitors in the management of erectile dysfunction. *P T* 38:407-419
71. Rosen RC, McKenna KE (2002) PDE-5 inhibition and sexual response: pharmacological mechanisms and clinical outcomes. *Annu Rev Sex Res* 13:36-88
72. Nieoczym D, Łuszczki JJ, Czuczwar SJ, Właż P (2010) Effect of sildenafil on the anticonvulsant action of classical and second-generation antiepileptic drugs in maximal electroshock-induced seizures in mice. *Epilepsia* 51:1552-1559
73. Nieoczym D, Socafa K, Rundfeldt C, Właż P (2010) Effects of sildenafil on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice and amygdala-kindled seizures in rats. *Pharmacol Rep* 62:383-391
74. Nieoczym D, Socafa K, Łuszczki JJ, Czuczwar SJ, Właż P (2012) Influence of sildenafil on the anticonvulsant action of selected antiepileptic drugs against pentylenetetrazole-induced clonic seizures in mice. *J Neural Transm* 119:923-931
75. Nieoczym D, Socafa K, Jedziniak P, Olejnik M, Właż P (2013) Effect of sildenafil, a selective phosphodiesterase 5 inhibitor, on the anticonvulsant action of some antiepileptic drugs in the mouse 6-Hz psychomotor seizure model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 47:104-110
76. Riazzi K, Roshanpour M, Rafiei-Tabatabaei N, Homayoun H, Ebrahimi F, Dehpour AR (2006) The proconvulsant effect of sildenafil in mice: role of nitric oxide-cGMP pathway. *Br J Pharmacol* 147:935-943
77. Okuyucu EE, Guven O, Duman T, Gorur S, Melek IM, Akcin S, Yilmazer S (2009) EEG abnormalities during treatment with tadalafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Neurol Res* 31:313-315
78. Calabro RS, Reitano S, Bramanti P (2013) Tadalafil-induced tonic-clonic seizures in a 23-year-old man. *Epilepsy Behav* 28:519-520
79. Demchenko IT, Ruehle A, Allen BW, Vann RD, Piantadosi CA (2009) Phosphodiesterase-5 inhibitors oppose hyperoxic vasoconstriction and accelerate seizure development in rats exposed to hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* (1985) 106:1234-1242
80. Kamiński K, Zagaja M, Łuszczki JJ, Rapacz A, Andres-Mach M, Latacz G, Kiec-Kononowicz K (2015) Design, synthesis, and anticonvulsant activity of new hybrid compounds derived from 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)propanamides and 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)butanamides. *J Med Chem* 58:5274-5286
81. Haller CA, Meier KH, Olson KR (2005) Seizures reported in association with use of dietary supplements. *Clin Toxicol (Phila)* 43:23-30
82. Samuels N, Finkelstein Y, Singer SR, Oberbaum M (2008) Herbal medicine and epilepsy: proconvulsive effects and interactions with antiepileptic drugs. *Epilepsia* 49:373-380

Kataryna Socafa