



AUTOREFERAT

DOROTA NIEOCZYM

Zakład Fizjologii Zwierząt

Wydział Biologii i Biotechnologii

Lublin 2019

1. Imię i nazwisko

Dorota Nieoczym

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 2008 – 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 drgawkową w zwierzęcych modelach drgawek eksperymentalnych oraz jego interakcje z wybranymi lekami przeciwpadaczkowymi”*

Promotor: prof. dr hab. Piotr Wlaź

- 2003 – magister biologii (specjalność: biologia środowiskowa)

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

Praca magisterska pt. *„Analiza polipeptydów i białek humoralnej odpowiedzi immunologicznej u larw Galleria mellonella”*

Promotor: prof. dr hab. Teresa Jakubowicz

- 2001 – tytuł zawodowy licencjata biologii

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

Praca licencjacka pt. *„Typy torfowisk wysokich oraz udział komponentów sfagnowych w ich budowie”*

Promotor: dr Mirosława Bloch

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2009–obecnie	adiunkt w Zakładzie Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
2004–2009	asystent w Zakładzie Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet 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 pięciu oryginalnych prac naukowych opublikowanych w czasopismach z listy *Journal Citation Reports* (JCR) w latach 2014–2019. Sumaryczny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* (IF) powyższego cyklu wynosi 15,191, co opowiada 120 punktom MNiSW. We wszystkich pracach zawartych w cyklu jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondującym. Mój średni procentowy udział w prezentowanych publikacjach wynosi 84%.

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

**PRZECIWDRGAWKOWE WŁAŚCIWOŚCI WYBRANYCH ZWIĄZKÓW ORAZ ICH WPŁYW
NA AKTYWNOŚĆ LEKÓW PRZECIWPADACZKOWYCH W DOŚWIADCZALNYCH
MODELACH DRGAWEK PADACZKOWYCH**

4.2 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

- H1. Nieoczym D***, Socała K, Raszewski G, Wlaź P. (2014) *Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 54:50-58.

IF₂₀₁₄ = 3,689; MNiSW₂₀₁₄ = 35 pkt; *autor korespondujący

- H2. Nieoczym D***, Socała K, Wlaź P. (2017) *Evaluation of the anticonvulsant effect of brilliant blue G, a selective P2X7 receptor antagonist, in the iv PTZ-, maximal electroshock-, and 6 Hz-induced seizure tests in mice.* Neurochem Res. 42(11):3114-3124.

IF₂₀₁₇ = 2,772; MNiSW₂₀₁₆ = 20 pkt; *autor korespondujący

- H3. Nieoczym D***, Socała K, Wlaź P. (2018) *Assessment of the anticonvulsant potency of ursolic acid in seizure threshold tests in mice.* Neurochem Res. 43(5):995-1002.

IF₂₀₁₇ = 2,772; MNiSW₂₀₁₆ = 20 pkt; *autor korespondujący

- H4. Nieoczym D***, Socała K, Gawel K, Esguerra C V, Wyska E, Wlaź P. (2019) *Anticonvulsant activity of pterostilbene in zebrafish and mouse acute seizure tests.* Neurochem Res. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02735-2>

IF₂₀₁₇ = 2,772; MNiSW₂₀₁₆ = 20 pkt; *autor korespondujący

- H5. Nieoczym D***, Socała K, Jedziniak P, Wyska E, Wlaź P. (2019) *Effect of pterostilbene, a natural analog of resveratrol, on the activity of some antiepileptic drugs in the acute seizure tests in mice.* Neurotox Res. DOI: 10.1007/s12640-019-00021-1

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

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

Padaczka jest jednym z najczęstszych zaburzeń neurologicznych, które dotyka 1% populacji, co stanowi ok. 65 milionów ludzi na całym świecie (1, 2). Występuje ona u osób w każdym wieku, chociaż większy współczynnik zachorowalności na padaczkę notuje się u dzieci w pierwszych latach życia, a także u osób po 60. roku życia (3, 4). Międzynarodowa Liga Przeciwpadaczkowa (*International League Against Epilepsy* – ILAE) oraz Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization* – WHO) zdefiniowały padaczkę jako chorobę charakteryzującą się nawracającymi spontanicznymi napadami, które są wynikiem nieprawidłowych, nadmiernych i zsynchronizowanych wyładowań komórek nerwowych w obrębie centralnego układu nerwowego (5). Przebieg napadów padaczkowych jest bardzo różnorodny – od niewielkich zaburzeń świadomości po zaburzenia motoryczne, sensoryczne, wegetatywne i psychiczne,

uzależnione od struktur mózgu, w których doszło do zakłócenia sygnałów elektrycznych. Same napady padaczkowe powodują w obrębie tkanki mózgowej zmiany strukturalne i funkcjonalne, które sprzyjają powstawaniu kolejnych napadów (3).

Diagnoza padaczki jest trudna i złożona, ponieważ choroba ta nie posiada specyficznych cech, które mogłyby być tzw. „złotym standardem” pomocnym w jej diagnozowaniu (2). Ogólnie przyjętym kryterium w diagnozowaniu padaczki jest wystąpienie u pacjenta co najmniej dwóch nieprovokowanych (lub odruchowych) napadów padaczkowych w odstępie czasowym dłuższym niż 24 godziny (5). Postęp wiedzy w zakresie znajomości patomechanizmów zaburzeń padaczkowych przyczynił się do uaktualnienia definicji padaczki i sformułowania dodatkowych kryteriów służących diagnozowaniu tego schorzenia. Zgodnie z nowymi zaleceniami ILAE, padaczkę diagnozuje się również u osób, u których wystąpił tylko jeden nieprovokowany (lub odruchowy) napad padaczkowy, ale istnieje u nich wysokie (co najmniej 60-procentowe) prawdopodobieństwo nawrotu takiego napadu (tj. 2 nieprovokowane napady w ciągu 10 lat obserwacji). Znaczne ryzyko wystąpienia powtórnych napadów padaczkowych występuje w przypadku m.in. udarów mózgu, infekcji i urazów centralnego układu nerwowego. Padaczkę diagnozuje się również u pacjentów, u których na podstawie obrazu klinicznego i zapisu elektroencefalograficznego rozpoznano zespół padaczkowy (6). Wśród przyczyn zaburzeń padaczkowych wyróżnia się m.in. czynniki genetyczne i immunologiczne, nieprawidłowości strukturalne lub metaboliczne oraz infekcje (2).

Komisja ds. Klasyfikacji i Nazewnictwa ILAE zweryfikowała w 2017 roku obowiązującą wówczas klasyfikację napadów padaczkowych. Zgodnie z obecnymi zaleceniami wyróżnia się trzy podstawowe rodzaje napadów – napady ogniskowe, uogólnione i napady o nieznanym początku. Wśród napadów ogniskowych wyróżniono napady przebiegające z zaburzeniami oraz bez zaburzeń świadomości. Jednym z rodzajów napadów ogniskowych są też wtórnie uogólnione napady toniczno-kloniczne. W grupie napadów uogólnionych oraz tych o nieznanym początku wyróżnione zostały napady z manifestacjami ruchowymi (m.in. napady toniczne, kloniczne, toniczno-kloniczne, miokloniczne, atoniczne) oraz napady z objawami innymi niż ruchowe (6).

Bezpośrednią przyczyną napadów padaczkowych jest nadmierna aktywność komórek nerwowych spowodowana depolaryzacją ich błon komórkowych. Nadmierne i zsynchronizowane wyładowania neuronów są wynikiem braku równowagi między procesami pobudzania i hamowania w obrębie centralnego układu nerwowego. Przewaga procesów pobudzania komórek nerwowych prowadzi do powstawania napadów padaczkowych, natomiast nasilanie procesów hamowania zapobiega ich rozwojowi (7). Aktywność komórek nerwowych jest kontrolowana przez układy neuroprzekaźnikowe – w przypadku padaczki największe znaczenie ma hamujące działanie kwasu γ -aminomasłowego (GABA) oraz pobudzające wpływy kwasu glutaminowego, a także bramkowane ligandami i zmianami napięcia błony komórkowej kanały i pompy jonowe. W modelach doświadczalnych drgawki padaczkowe mogą być wywoływane podaniem związków modyfikujących aktywność powyższych układów neuroprzekaźnikowych, np. pentetrazolu (PTZ), który jest antagonistą receptora GABA_A, czy też kwasu *N*-metylo-D-asparaginowego (NMDA) i kwasu kainowego (KA), które pobudzają receptory kwasu glutaminowego (3).

Chociaż zaburzenia pobudliwości komórek nerwowych są bezpośrednią przyczyną napadów padaczkowych, to w powstawaniu i rozwoju tych nieprawidłowości uczestniczy wiele szlaków i mechanizmów neurobiologicznych, które są jednocześnie potencjalnymi miejscami uchwytu dla nowych terapii przeciwpadaczkowych. Można tutaj wymienić m.in. gromadzenie białek neurodegeneracyjnych (np. białko tau, β -amyloid), procesy neurogenezy i neurodegeneracji, procesy zapalne (np. interleukina 1 β , transformujący czynnik wzrostu β , kinaza receptora TGF β typu 1), zmiany struktury i aktywności błonowych kanałów jonowych bramkowanych napięciem lub ligandami, wydzielanie i wychwyt zwrotny neuroprzekaźników, wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałne (np. neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego – BDNF, receptory Trk), szlak ssaczego celu rapamycyny (ang. *mammalian target of rapamycin*, mTOR), a także aktywację komórek mikrogleju (2).

Podstawowym sposobem leczenia zaburzeń padaczkowych jest farmakoterapia, której zadaniem jest zahamowanie lub przynajmniej istotne ograniczenie występowania napadów. Mechanizm działania dostępnych leków przeciwpadaczkowych związany jest głównie z nasilaniem hamującego neuroprzekaźnictwa GABAergicznego, osłabianiem pobudzającego neuroprzekaźnictwa glutaminianergicznego oraz oddziaływaniem na

aktywność kanałów jonowych, głównie sodowych, a także potasowych i wapniowych (8).

Chociaż na rynku farmaceutycznym dostępnych jest ponad 20 leków przeciwpadaczkowych, to u ok. 30% pacjentów z padaczką nie udaje się osiągnąć satysfakcjonujących efektów terapeutycznych po zastosowaniu jednego leku przeciwpadaczkowego (2, 4, 9). Pacjenci tacy wymagają leczenia przy użyciu terapii skojarzonej. Jeżeli zastosowanie dwóch odpowiednio dobranych i dobrze tolerowanych schematów leczenia nie przyniosło oczekiwanych efektów terapeutycznych, to taką padaczkę, zgodnie z wytycznymi ILAE, klasyfikuje się jako lekooporną (10). Niestety, wprowadzenie na rynek farmaceutyczny nowych leków przeciwpadaczkowych nie zwiększyło istotnie skuteczności terapii farmakologicznej i nie ograniczyło występowania przypadków padaczki lekoopornej. Dane zebrane w Stanach Zjednoczonych w latach 2013–2015 wykazały, że ponad połowa pacjentów przyjmujących leki przeciwpadaczkowe nadal doświadcza nawracających napadów padaczkowych (2). U pacjentów, u których terapia farmakologiczna nie przynosi satysfakcjonujących efektów, należy rozważyć zastosowanie innych metod leczenia, np. diety ketogennej, zabiegów chirurgicznych lub neurostymulacji (2).

Tylko kilka spośród dostępnych na rynku farmaceutycznym leków przeciwpadaczkowych jest stosowanych jako tzw. leki pierwszego wyboru. Niektóre z nich są skuteczne zarówno w przypadku napadów ogniskowych, jak i uogólnionych (np. benzodiazepiny, lamotrygina, lewetiracetam, perampanel, fenobarbital, topiramata, kwas walproinowy, zonisamid), niektóre natomiast są stosowane wyłącznie w przypadku napadów ogniskowych (np. briwaracetam, karbamazepina, octan eslikarbazepiny, gabapentyna, lakosamid, okskarbazepina, fenytoina, pregabalina, tiagabina i wigabatryna). Wybór leku przeciwpadaczkowego uzależniony jest nie tylko od rodzaju napadów padaczkowych, ale również od czynników takich jak wiek, płeć, ciąża, tolerancja danego leku oraz współistniejące choroby i inne przyjmowane leki. Leki przeciwpadaczkowe powinny być też tak dobierane, aby zapobiegały wystąpieniu stanu padaczkowego u pacjentów z częstymi i/lub długotrwałymi napadami padaczkowymi (2).

Dodatkowym problemem w farmakoterapii zaburzeń padaczkowych jest występowanie działań niepożądanych, wśród których często notowane są zaburzenia

neuropsychiatryczne, np. zmęczenie, zawroty głowy, nerwowość. Leki przeciwpadaczkowe mogą również negatywnie wpływać na inne funkcje organizmu (2). Na rynku farmaceutycznym dostępne są obecnie leki pierwszej, drugiej i trzeciej generacji. Leki z tych grup nie różnią się istotnie pod kątem działania przeciwdrgawkowego, uznaje się jednak, że leki drugiej i trzeciej generacji wykazują mniej liczne i słabsze działania niepożądane. Działania niepożądane powodują pogorszenie jakości życia pacjenta i mogą być na tyle uciążliwe i/lub trudne do zaakceptowania, że konieczne jest przerwanie leczenia. Dlatego też ciągle istnieje potrzeba poszukiwania nowych, skuteczniejszych i bezpieczniejszych leków przeciwpadaczkowych.

Istotnym narzędziem w procesie wstępnego skriningu związków o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym są zwierzęce modele drgawek padaczkowych, a wśród nich modele drgawek indukowanych związkami chemicznymi, np. PTZ, pilokarpiną, KA, oraz modele drgawek wywoływanych stymulacją elektryczną, np. test maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) i model drgawek psychomotorycznych wywoływanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz u myszy (3, 11, 12). W ostatnim czasie coraz częściej wykorzystywane są również modele drgawek padaczkowych wywoływanych PTZ u larw lub dorosłych osobników danio pręgowanego (*Danio rerio*) (13, 14).

Celem badań będących przedmiotem przedłożonego wniosku była ocena przeciwdrgawkowego działania wybranych związków chemicznych w zwierzęcych modelach drgawek padaczkowych. Badaniu poddano 4 związki pochodzenia naturalnego, tj. rutynę, kwercetynę, kwas ursolowy (UA) i pterostilben (PTE), oraz jeden związek syntetyczny – błękit brylantowy G (BBG). W przypadku kwercetyny oraz PTE zbadany został również ich wpływ na aktywność wybranych leków przeciwpadaczkowych w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych.

W badaniach wykorzystano trzy doświadczalne modele drgawek padaczkowych u myszy, tj:

1. Model drgawek wywoływanych dożylną infuzją PTZ (*iv* PTZ)

PTZ jest antagonistą miejsca wiązania pikrotoksyny w kompleksie receptora GABA_A. W teście tym jest on podawany do bocznej żyły ogonowej myszy, co powoduje rozwój drgawek padaczkowych, które początkowo przyjmują postać krótkich drgawek

mioklonicznych przechodzących następnie w uogólnione drgawki kloniczne z utratą prawidłowej postawy ciała. Dalsza infuzja PTZ powoduje wystąpienie tonicznego wyprostu kończyn przednich i tylnych. Drgawki toniczne w większości przypadków są drgawkami letalnymi. W teście *iv* PTZ określany jest próg pobudliwości drgawkowej dla poszczególnych rodzajów drgawek, tj. średnia dawka PTZ (w mg/kg) wywołująca określony typ drgawek u zwierząt w danej grupie doświadczalnej (11, 15).

Model drgawek *iv* PTZ jest bardzo czułym testem, umożliwia zbadanie zarówno przeciwdrgawkowego, jak i prodrgawkowego działania związków chemicznych, a także czynników nefarmakologicznych, przy użyciu stosunkowo niewielkiej liczby zwierząt doświadczalnych. Test drgawek PTZ jest uznany za model napadów mioklonicznych oraz uogólnionych napadów nieświadomości u człowieka (11, 16). Został on wykorzystany w doświadczeniach opisanych w publikacjach **H1–H5**.

2. Test MES

Test ten jest jednym z najczęściej stosowanych modeli służących ocenie przeciwdrgawkowego działania nowych związków, jest on uznany za tzw. „złoty standard” w badaniach przedklinicznych leków przeciwpadaczkowych. Krótkotrwały (0,2 s) bodziec elektryczny o częstotliwości 50 Hz powoduje wystąpienie u myszy tonicznego wyprostu kończyn tylnych, który określany jest jako tzw. drgawki maksymalne. W teście MES działanie przeciwdrgawkowe wykazują przede wszystkim związki działające poprzez wpływ na kanały sodowe, np. karbamazepina i fenytoina, ale również te związki, których mechanizm działania związany jest z nasilaniem hamującego neuroprzekąźnictwa GABAergicznego, np. fenobarbital, czy też osłabieniem pobudzającej neurotransmisji glutaminianergicznej, np. topiramatu. Drgawki maksymalne są uznawane za odpowiednik uogólnionych napadów toniczno-klonicznych u człowieka (17).

W artykułach stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe zastosowano test progu maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MEST), który służy ocenie progu drgawkowego dla drgawek maksymalnych (publikacje **H1–H4**), oraz standardowy test MES, który służy wyznaczeniu dawki efektywnej ED₅₀ badanych związków, tj. dawki, która chroni 50% testowanych zwierząt przed wystąpieniem drgawek maksymalnych (publikacja **H5**) (17).

3. Test drgawek wywołanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz

W przeciwieństwie do testu MES, w teście drgawek psychomotorycznych zwierzęta otrzymują długotrwały bodziec elektryczny (3 s) o niskiej częstotliwości, tj. 6 Hz. Stymulacja ta powoduje wystąpienie minimalnych drgawek klonicznych kończyn przednich, po których następują ruchy stereotypowe i automatyzmy (m.in. znieruchomienie, drżenie wibrysów, tzw. *Straub tail*), które przypominają aurę u pacjentów z padaczką częściową lub limbiczną (18, 19). Podobnie jak w przypadku maksymalnego wstrząsu elektrycznego, w doświadczeniach przedklinicznych stosowany jest test progu drgawek psychomotorycznych (publikacja **H1–H4**) oraz test, w którym zwierzęta stymulowane są bodźcami supramaksymalnymi (32 lub 44 mA) w celu wyznaczenia dawki ED₅₀ badanych związków (publikacja **H1, H4 i H5**). Ze względu na brak aktywności przeciwdrgawkowej fenytoiny w teście drgawek psychomotorycznych, test ten był opisywany jako model drgawek lekoopornych. W ostatnim czasie jego użyteczność w zakresie badań drgawek lekoopornych jest jednak mocno kwestionowana (12).

W doświadczeniach, których celem było zbadanie przeciwdrgawkowego działania PTE (publikacja **H4**) wykorzystany został również **model drgawek PTZ u larw danio przegowanego**. Modele drgawkowe u danio przegowanego są stosowane od niedawna jako alternatywa dla wprowadzonych wcześniej i szeroko stosowanych modeli drgawkowych u gryzoni. W wielu przypadkach są one też wykorzystywane do wstępnej oceny właściwości przeciwdrgawkowych badanych związków. Model drgawek wywoływanych podaniem PTZ u danio przegowanego został już stosunkowo dobrze poznany i zweryfikowany. Zmiany behawioralne, elektrofizjologiczne oraz molekularne obserwowane u larw danio przypominają zmiany obserwowane również u gryzoni (13, 14).

Zastosowanie różnych testów drgawkowych umożliwiło ocenę działania przeciwdrgawkowego badanych substancji pod kątem różnych rodzajów drgawek padaczkowych. Charakterystyka badanych substancji wraz z wyjaśnieniem przyczyn ich wyboru oraz wyniki przeprowadzonych doświadczeń zostały opisane poniżej.

H1. Nieoczym D, Socała K, Raszewski G, Wlaź P. (2014) *Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 54:50-58.

Kwercetyna i rutyna to jedne z najlepiej poznanych i powszechnie występujących flawonoidów. Rutyna jest glikozydem kwercetyny, który jest metabolizowany w organizmie do pochodnych kwercetyny (20, 21). Oba te związki są obecne zarówno w roślinach stosowanych w ziołolecznictwie, jak i w tych, które są składnikami podstawowej diety człowieka. Ze względu na szereg właściwości farmakologicznych, m.in. działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne i przeciwwirusowe, są one też składnikami licznych leków i suplementów diety podnoszących odporność organizmu. Preparaty te mogą być przyjmowane przez pacjentów cierpiących na padaczkę, co powoduje, że mogą one wpływać zarówno na aktywność drgawkową, jak i działanie przyjmowanych leków przeciwpadaczkowych.

Zdolność flawonoidów do przechodzenia bariery krew-mózg sprawia, że mogą one również wpływać na funkcje centralnego układu nerwowego (22, 23). W badaniach eksperymentalnych stwierdzono przeciwlękowe, przeciwdrgawkowe i sedacyjne działanie rutyny i kwercetyny (24-27), co może wynikać m.in. z wpływu tych związków na neuroprzekąźnictwo GABAergiczne. Rutyna i kwercetyna, a także ekstrakty roślinne zawierające w swoim składzie te flawonoidy, poprawiały pamięć i zdolność uczenia (28-30) oraz wykazywały właściwości przeciwdepresyjne (31, 32) w modelach doświadczalnych. Wyniki wcześniejszych doświadczeń wskazywały na możliwość przeciwdrgawkowego działania rutyny i kwercetyny (24, 26, 27, 29).

Doświadczenia, których celem było zbadanie wpływu rutyny i kwercetyny na progi aktywności drgawkowej w mysich modelach drgawek padaczkowych, zostały opisane w publikacji **H1**. Aktywność tych związków została zbadana w teście *iv* PTZ, MEST oraz w teście progu drgawek psychomotorycznych wywoływanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz u myszy. Ze względu na szerokie rozpowszechnienie badanych flawonoidów zarówno w diecie człowieka, jak i w preparatach leczniczych oraz suplementach diety, zbadano również wpływ kwercetyny na aktywność dwóch wybranych leków przeciwpadaczkowych, tj. kwasu walproinowego (lek przeciwpadaczkowy pierwszej generacji) oraz lewetiracetamu (lek przeciwpadaczkowy drugiej generacji) w teście drgawek psychomotorycznych wywoływanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz u myszy (test, w którym rutyna i kwercetyna wykazywały istotne działanie przeciwdrgawkowe). Działania niepożądane rutyny i kwercetyny, a także kombinacji kwercetyny z badanymi lekami przeciwpadaczkowymi

oceniono w teście komina (wpływ na koordynację ruchową), siły chwytu (wpływ na siłę mięśni szkieletowych) oraz biernego unikania (wpływ na pamięć długotrwałą) u myszy.

Pierwszym etapem przeprowadzonych doświadczeń było określenie czasu maksymalnego działania (*time-course effect*) przeciwdrgawkowego rutyny i kwercetyny w teście progu drgawek psychomotorycznych. Istotne statystycznie działanie przeciwdrgawkowe stwierdzono po 30 oraz 60 min od momentu ich dootrzewnowego (*ip*) podania w dawce 400 mg/kg. Badania farmakokinetyczne kwercetyny, które zostały przeprowadzone przy współpracy z prof. dr. hab. Grzegorzem Raszewskim z Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie, wykazały, że czas maksymalnego działania kwercetyny w teście 6 Hz był skorelowany z wysokim stężeniem tego związku w mózgu zwierząt doświadczalnych. Na podstawie tych wyników zdecydowano, że rutyna i kwercetyna będą podawane zwierzętom 45 min przed testami behawioralnymi. Kolejne doświadczenia wykazały, że rutyna i kwercetyna podawane *ip* w dawkach od 100 do 800 mg/kg nie wpływają w sposób istotny statystycznie na próg drgawek mioklonicznych, uogólnionych drgawek klonicznych oraz tonicznych w teście *iv* PTZ u myszy. Nie zaobserwowano również istotnych statystycznie zmian wartości progu maksymalnego wstrząsu elektrycznego (dawki 100–800 mg/kg) po podaniu tych związków. Wzrost progu drgawkowego stwierdzono natomiast w teście drgawek psychomotorycznych wywołanych prądem elektrycznym o częstotliwości 6 Hz. W przypadku obu badanych substancji zmiany istotne statystycznie obserwowano dla dawek od 10 do 800 mg/kg. Wyniki doświadczeń opisanych w publikacji **H1** pozwalają przypuszczać, że przeciwdrgawkowe działanie rutyny i kwercetyny może być związane m.in. z aktywacją kinazy białkowej aktywowanej AMP (AMPK). Substancja C – selektywny i odwracalny inhibitor AMPK, znosił przeciwdrgawkowe działanie kwercetyny w teście drgawek psychomotorycznych.

Kwercetyna podawana w zakresie dawek 200–400 mg/kg nie wpływała w sposób istotny statystycznie na aktywność kwasu walproinowego i lewetiracetamu w teście drgawek psychomotorycznych. Rutyna i kwercetyna (dawki 200–800 mg/kg), a także kombinacje kwercetyny z badanymi lekami przeciwpadaczkowymi, nie wpływały w sposób istotny statystycznie na siłę mięśni szkieletowych, koordynację ruchową oraz pamięć długotrwałą u myszy.

Wyniki doświadczeń przedstawionych w publikacji **H1** wykazały nieznaczne działanie przeciwdrgawkowe rutyny i kwercetyny, co nie potwierdziło w pełni wcześniejszych doniesień o właściwościach przeciwdrgawkowych tych flawonoidów. Brak wpływu kwercetyny na aktywność kwasu walproinowego i lewetiracetamu pozwala przypuszczać, że przyjmowane przez pacjentów z padaczką preparatów zawierające rutynę i/lub kwercetynę nie będzie wpływało na skuteczności tych leków przeciwpadaczkowych. Co więcej, rutyna i kwercetyna wydają się być związkami bezpiecznymi, które nie powinny negatywnie wpływać na siłę mięśni szkieletowych, koordynację ruchową i pamięć u pacjentów.

H2. Nieoczym D, Socała K, Wlaź P. (2017) *Evaluation of the anticonvulsant effect of brilliant blue G, a selective P2X7 receptor antagonist, in the iv PTZ-, maximal electroshock-, and 6 Hz-induced seizure tests in mice.* Neurochem Res. 42(11):3114-3124.

W publikacji **H2** przedstawiono wyniki doświadczeń mających na celu zbadanie przeciwdrgawkowego działania BBG – selektywnego antagonisty jonotropowych receptorów purynergicznym P2X7 (33), w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych u myszy. Wpływ jednorazowych i subchronicznych (7-dniowych) podań BBG na próg aktywności drgawkowej badany był w trzech testach drgawkowych, tj. w teście *iv* PTZ, MEST oraz w teście progu drgawek psychomotorycznych indukowanych prądem elektrycznym o częstotliwości 6 Hz u myszy. W celu poznania ewentualnych działań niepożądanych, działanie BBG zostało również zbadane w teście komina i siły chwytu u myszy.

Zainteresowanie rolą receptorów P2X7 w patomechanizmie padaczki oraz innych chorób neurologicznych znacznie wzrosło na przestrzeni ostatniej dekady (34-38). Receptory te pobudzane są wysokim stężeniem ATP, umożliwiają nieselektywny przepływ jonów Na⁺, K⁺ i Ca²⁺ przez błonę komórkową, regulują wydzielanie neuroprzekazników (np. GABA, kwasu glutaminowego, ATP) i biorą udział we wzajemnej komunikacji komórek glejowych oraz komórek glejowych i nerwowych (35, 36, 38, 39). BBG został wybrany do badań na podstawie dostępnych w literaturze naukowej informacji o ochronnym działaniu antagonistów receptora P2X7 w doświadczalnych modelach padaczki (36, 40-42).

Wyniki doświadczenia, którego celem było wyznaczenie czasu maksymalnego działania (*time-course effect*) BBG wykazały, że związek ten powoduje istotny statystycznie wzrost progu dla drgawek psychomotorycznych w okresie od 15 do 60 min po podaniu (*ip*), przy czym najsilniejszy efekt był obserwowany po 30 min od iniekcji. Na podstawie tych wyników zdecydowano, że BBG będzie podawany zwierzętom 30 min przed wykonywanymi testami behawioralnymi. Wyniki kolejnych doświadczeń nie potwierdziły w pełni wcześniejszych przypuszczeń o właściwościach przeciwdrgawkowych badanego antagonisty receptorów P2X7. Dootrzewnowe jednorazowe (dawki 100–400 mg/kg) oraz subchroniczne (dawki 25–100 mg/kg) podania BBG nie wpływały w sposób istotny statystycznie na progi drgawkowe w teście *iv* PTZ oraz MEST. Zarówno ostre (dawka 100 i 200 mg/kg), jak i subchroniczne (dawka 100 mg/kg) podania BBG powodowały natomiast istotny statystycznie wzrost progu drgawek psychomotorycznych wywołanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz u myszy. BBG nie wykazywał istotnego działania w teście komina i siły chwytu u myszy, co sugeruje, że zablokowanie receptora P2X7 nie powoduje działań niepożądanych w zakresie koordynacji ruchowej i siły mięśni szkieletowych.

Wyniki doświadczeń opisanych w publikacji **H2** nie potwierdziły przeciwdrgawkowych właściwości badanego antagonisty receptorów P2X7, co wskazuje na brak możliwości wykorzystania związków hamujących aktywność tych receptorów jako skutecznych leków przeciwpadaczkowych. Można przypuszczać, że pomimo udowodnionego zaangażowania tych receptorów w procesy epileptogenezy nie mają one istotnego znaczenia w procesie hamowania napadów padaczkowych lub wpływ ten może być ograniczony i związany jedynie z niektórymi rodzajami drgawek.

H3. Nieoczym D, Socała K, Wlaź P. (2018) *Assessment of the anticonvulsant potency of ursolic acid in seizure threshold tests in mice.* Neurochem Res. 43(5):995-1002.

Celem doświadczeń opisanych w publikacji **H3** było zbadanie przeciwdrgawkowego działania UA w trzech doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych, tj. w teście *iv* PTZ, MEST i teście progu drgawek psychomotorycznych indukowanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz u myszy.

UA jest przedstawicielem triterpenoidów, występuje w roślinach leczniczych (np. kocimiętka, mącznica lekarska, żurawina), przyprawach (np. majeranek, bazylia, oregano, tymianek) oraz owocach (np. jabłka, gruszki, śliwki), w formie wolnej lub

w formie pochodnych glikozydowych. Związek ten przyciąga uwagę naukowców ze względu na liczne właściwości farmakologiczne, które obejmują m.in. działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, a także przeciwnowotworowe (43, 44). W modelach doświadczalnych stwierdzono również jego działanie przeciwdepresyjne (45-47), przeciwdrgawkowe (48, 49) i przeciwłękowe (50-52), co mogło być wynikiem wzrostu stężenia GABA w strukturach centralnego układu nerwowego (53).

Doświadczenia opisane w publikacji **H3** rozpoczęto od ustalenia czasu maksymalnego działania (*time-course effect*) UA w teście drgawek psychomotorycznych indukowanych prądem elektrycznym o częstotliwości 6 Hz. Istotny statystycznie wzrost progu drgawek psychomotorycznych zaobserwowano po 120 min od podania UA w dawce 50 mg/kg. Na tej podstawie przyjęto, że badany związek będzie podawany zwierzętom doświadczalnym 120 min przed testami behawioralnymi. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały przeciwdrgawkowe działanie UA (dawki 50 i 100 mg/kg) w teście progu drgawek psychomotorycznych oraz MEST u myszy. Związek ten w dawkach 10–100 mg/kg nie wpływał w sposób istotny statystycznie na próg drgawek mioklonicznych, uogólnionych drgawek klonicznych oraz drgawek tonicznych w teście *iv* PTZ u myszy. Badane dawki UA nie wpływały również w sposób istotny statystycznie na siłę mięśni szkieletowych w teście siły chwytu oraz koordynację ruchową w teście komina u myszy.

Podsumowując, wyniki doświadczeń opisanych w publikacji **H3** jedynie częściowo potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia o przeciwdrgawkowych właściwościach UA. Działanie to wydaje się być ograniczone jedynie do określonych rodzajów drgawek padaczkowych, co znacząco ogranicza możliwość wykorzystania tego związku w terapii zaburzeń padaczkowych. UA wydaje się być związkiem bezpiecznym, ponieważ nie powodował działań niepożądanych związanych z wpływem na siłę mięśni szkieletowych i koordynację ruchową zwierząt. Znajomość właściwości oraz struktury UA może być wskazówką w procesie dalszego poszukiwania nowych związków o podobnej strukturze, ale silniejszym działaniu przeciwdrgawkowym.

H4. Nieoczym D, Socała K, Gawel K, Esguerra C V, Wyska E, Wlaź P. (2019)
Anticonvulsant activity of pterostilbene in zebrafish and mouse acute seizure tests.
Neurochem Res. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02735-2>

PTE jest naturalnym dimetylowanym analogiem resweratrolu, który początkowo był wyizolowany z drzewa sandałowego, a w późniejszym czasie stwierdzony również w jagodach, winogronach i orzeszkach ziemnych (54). Ze względu na liczne działania prozdrowotne, m.in. działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwnowotworowe, przeciwcukrzycowe i kardioprotekcyjne, związek ten przyciąga w ostatnim czasie uwagę naukowców i jest przedmiotem licznych badań (55, 56). W porównaniu do resweratrolu, PTE charakteryzuje się większą lipofilnością, co istotnie zwiększa jego biodostępność i zdolność przenikania przez błony w organizmie po podaniu doustnym. Zdolność przenikania bariery krew-mózg (55, 57) powoduje, że PTE może działać ośrodkowo, co zostało zresztą potwierdzone w licznych badaniach eksperymentalnych. PTE poprawiał funkcje kognitywne w mysich modelach starzenia i choroby Alzheimera (58), wykazywał również działanie przeciwlękowe w teście podniesionego labiryntu krzyżowego u myszy (57). Działanie przeciwdrgawkowe PTE nie było dotychczas badane, chociaż stwierdzono wcześniej ochronne działanie resweratrolu w doświadczalnych modelach padaczki (59, 60). Resweratrol nie wykazywał przeciwdrgawkowego działania w modelach ostrych drgawek padaczkowych, tj. w teście MES oraz drgawek psychomotorycznych wywoływanych stymulacją o częstotliwości 6 Hz (61).

Celem doświadczeń opisanych w publikacji **H4** było zbadanie przeciwdrgawkowych właściwości PTE w modelach doświadczalnych. Działanie to zostało najpierw ocenione w teście drgawek indukowanych PTZ u larw danio pręgowanego, a następnie w teście *iv* PTZ, MEST i drgawek psychomotorycznych wywołanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz u myszy. Sprawdzono również bezpieczeństwo tego związku pod kątem jego wpływu na koordynację ruchową, siłę mięśni szkieletowych oraz aktywność lokomotoryczną u myszy.

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych z zastosowaniem modelu drgawek wywoływanych PTZ u larw danio pręgowanego wykazały istotne działanie przeciwdrgawkowe PTE. Związek ten w stężeniu 10 μM w sposób istotny statystycznie redukował indukowaną PTZ aktywność lokomotoryczną, a także zmniejszał liczbę oraz skracał czas trwania wyładowań padaczkowych obserwowanych w zapisie EEG u larw danio pręgowanego. Opisane powyżej doświadczenia zostały przeprowadzone przy

współpracy z dr Kingą Gawęł oraz prof. Camilą Esguerra z Norweskiego Centrum Medycyny Molekularnej w Oslo.

Doświadczenia z wykorzystaniem mysich modeli drgawek padaczkowych rozpoczęto od badań farmakokinetycznych, w toku których stwierdzono, że PTE jest bardzo szybko absorbowany z przestrzeni otrzewnowej osiągając maksymalne stężenie w surowicy i mózgu już po 15 min od podania. Oznaczenia farmakokinetyczne zostały wykonane przy współpracy z prof. dr hab. Elżbietą Wyską z Zakładu Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Czas maksymalnego działania przeciwdrgawkowego, który został oceniony w teście *iv* PTZ, nie był ściśle skorelowany z czasem wystąpienia maksymalnego stężenia PTE w mózgu, ponieważ maksymalny efekt przeciwdrgawkowy tego związku był obserwowany dopiero po 30 min od jego podania. Opóźnienie efektu behawioralnego w stosunku do czasu wystąpienia maksymalnego stężenia PTE w mózgu mogło być spowodowane zmianami aktywności szlaków wewnątrzkomórkowych, które następnie wpływały na układy neuroprzekąźnikowe i modyfikowały pobudliwość komórek nerwowych. Na podstawie powyższych wyników ustalono, że PTE będzie podawany zwierzętom 30 min przed planowanymi testami behawioralnymi. PTE w dawkach 100 i 200 mg/kg powodował istotny statystycznie wzrost progu aktywności drgawkowej w teście MEST, jak i w teście progu drgawek psychomotorycznych. W przypadku drgawek psychomotorycznych działanie PTE było na tyle silne, że możliwe było wyznaczenie jego dawki ED₅₀, która dla drgawek wywołanych stymulacją o natężeniu 32 mA wynosiła 505,6 mg/kg, natomiast przy stymulacji o natężeniu 44 mA wzrosła do 540,9 mg/kg. Dawki 100 i 200 mg/kg PTE powodowały również istotny statystycznie wzrost progu drgawek mioklonicznych w teście *iv* PTZ, natomiast istotny statystycznie wzrost progu dla uogólnionych drgawek klonicznych był stwierdzony jedynie w przypadku dawki 200 mg/kg. PTE (50–200 mg/kg) nie wykazywał istotnego statystycznie wpływu na próg dla drgawek tonicznych w teście *iv* PTZ. Testy oceniające działania niepożądane nie wykazały istotnego wpływu PTE (dawki 50–800 mg/kg) na siłę mięśni szkieletowych, koordynację ruchową oraz aktywność lokomotoryczną u myszy.

Podsumowując, wyniki doświadczeń opisanych w publikacji **H4** wykazały po raz pierwszy właściwości przeciwdrgawkowe PTE. Co więcej, nawet wysokie dawki tego

związku, tj. 400–800 mg/kg, nie powodowały istotnych działań niepożądanych w zakresie wpływu na aktywność lokomotoryczną, koordynację ruchową i siłę mięśni szkieletowych. Można przypuszczać, że PTE jest związkiem bezpiecznym, pozbawionym ciężkich działań toksycznych. Przedstawione wyniki sugerują, że PTE może zostać wykorzystany w terapii zaburzeń padaczkowych, ale wymagane jest przeprowadzenie dalszych bardziej szczegółowych badań sprawdzających wpływ tego związku na proces epileptogenezy w doświadczalnych modelach padaczki. Niezbędne jest również poznanie mechanizmu jego działania przeciwdrgawkowego.

H5. Nieoczym D, Socała K, Jedziniak P, Wyska E, Wlaź P. (2019) *Effect of pterostilbene, a natural analog of resveratrol, on the activity of some antiepileptic drugs in the acute seizure tests in mice.* Neurotox Res. DOI: 10.1007/s12640-019-00021-1

Wykazanie istotnego działania przeciwdrgawkowego PTE w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych u larw danio przegowanego oraz u myszy (publikacja **H4**) wskazuje na możliwość zastosowania tego związku w terapii zaburzeń padaczkowych. Fakt ten, a także możliwość jednoczesnego przyjmowania przez pacjentów z padaczką leków przeciwpadaczkowych i PTE jako suplementu diety, skłoniły mnie do zbadania wpływu tego związku na aktywność wybranych leków przeciwpadaczkowych w eksperymentalnych modelach drgawek padaczkowych u myszy, tj. w teście *iv* PTZ, MES i drgawek psychomotorycznych wywoływanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz. W każdym z tych testów zbadany został wpływ PTE na aktywność dwóch wybranych leków przeciwpadaczkowych (jeden klasyczny lek przeciwpadaczkowy oraz jeden lek przeciwpadaczkowy drugiej generacji), tj., klonazepamu i tiagabiny w teście *iv* PTZ, karbamazepiny i topiramatu w teście MES oraz kwasu walproinowego i okskarbazepiny w modelu drgawek psychomotorycznych. Przy wyborze leków przeciwpadaczkowych wzięto również pod uwagę ich skuteczność w danym modelu doświadczalnym. W toku doświadczeń zbadany został również wpływ kombinacji PTE z badanymi lekami przeciwpadaczkowymi na koordynację ruchową (w teście komina) i siłę mięśni szkieletowych (w teście siły chwytu) u myszy.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały, że PTE nasila aktywność przeciwdrgawkową klonazepamu w teście *iv* PTZ, karbamazepiny w teście MES, a także okskarbazepiny w teście drgawek psychomotorycznych u myszy. Oznaczenia stężeń tych trzech leków przeciwpadaczkowych w surowicy i mózgach zwierząt doświadczalnych

wykazały, że PTE zwiększał stężenie karbamazepiny i okskarbazepiny, ale nie wpływał w sposób istotny statystycznie na stężenie klonazepamu w surowicy i w mózgu u myszy. Wyniki te sugerują, że interakcje farmakologiczne zachodzące między PTE oraz karbamazepiną i okskarbazepiną miały charakter farmakokinetyczny, natomiast nasilenie aktywności przeciwdrgawkowej klonazepamu mogło wynikać z interakcji farmakodynamicznych. Wyniki otrzymane w teście siły chwytu wykazały również, że kombinacja PTE i karbamazepiny osłabia w sposób istotny statystycznie siłę mięśni szkieletowych u myszy.

Wyniki doświadczeń opisanych w publikacji **H5** wykazały, że PTE może nasilać aktywność niektórych leków przeciwpadaczkowych. Efekt ten może być wynikiem zarówno interakcji o charakterze farmakokinetycznym, jak i farmakodynamicznym. Interakcje farmakokinetyczne związane są ze zmianami stężenia danego leku w organizmie w wyniku oddziaływania na proces jego absorpcji, dystrybucji lub eliminacji, natomiast interakcje farmakodynamiczne dotyczą zmian aktywności leku w miejscu jego działania, np. w mózgu. Interakcje o charakterze farmakokinetycznym nie są pożądane w praktyce klinicznej, ponieważ kumulacja leku w organizmie może powodować nasilenie dotychczasowych i/lub powstanie nowych działań niepożądanych, które mogą być na tyle uciążliwe, że doprowadzą do przerwania podjętej wcześniej terapii. Wyniki doświadczeń opisanych w publikacji **H5** wykazały, że kombinacja PTE z niektórymi lekami przeciwpadaczkowymi, tj. karbamazepiną i okskarbazepiną, może prowadzić do wystąpienia niekorzystnych oddziaływań farmakokinetycznych między tymi związkami. Osłabienie siły mięśni szkieletowych w teście siły chwytu mogło być wynikiem kumulacji karbamazepiny w organizmie zwierząt doświadczalnych. Możliwe są jednak również interakcje farmakodynamiczne PTE z lekami przeciwpadaczkowymi, co zostało stwierdzone w przypadku klonazepamu. Taki rodzaj interakcji jest pożądany w praktyce klinicznej, ponieważ prowadzi on do nasilenia aktywności leku bez konieczności zwiększania stosowanej dawki.

Oznaczenia stężeń badanych leków przeciwpadaczkowych zostały wykonane przy współpracy z prof. dr hab. Elżbietą Wyską (Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie) oraz dr. hab. Piotrem Jedziniakiem (Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach).

Chociaż opisane w publikacji **H5** doświadczenia zostały przeprowadzone na zwierzętach, a otrzymane wyniki nie mogą być bezpośrednio zastosowane w praktyce klinicznej, to sugerują one jednak zachowanie dużej ostrożności w przypadku jednoczesnego przyjmowania leków przeciwpadaczkowych i PTE, ze względu na możliwość wystąpienia niekorzystnych interakcji o charakterze farmakokinetycznym. Konieczne są dalsze badania mające na celu dokładne zbadanie zarówno mechanizmów działania samego PTE, jak i jego wpływu na aktywność innych leków przeciwpadaczkowych w celu określenia profilu bezpieczeństwa stosowania tego związku.

Wnioski i podsumowanie

Wyniki doświadczeń opisanych w publikacjach przedłożonych jako osiągnięcie naukowe w postępowaniu habilitacyjnym pozwalają sformułować następujące wnioski:

1. Rutyna i kwercetyna wykazują jedynie niewielkie właściwości przeciwdrgawkowe, które wydają się być uzależnione od rodzaju drgawek padaczkowych. Wyniki opisanych doświadczeń nie potwierdziły wcześniejszych przypuszczeń o potencjale przeciwdrgawkowym tych związków, pozwalają jednak przypuszczać, że związki te, jako składniki licznych preparatów leczniczych oraz suplementów diety, mogą być bezpiecznie przyjmowane przez pacjentów z padaczką. Bezpieczne wydaje się być również przyjmowanie ich w połączeniu z niektórymi lekami przeciwpadaczkowymi, np. kwasem walproinowym i lewetiracetamem.
2. BBG – selektywny antagonist receptorów P2X7, nie posiada istotnego działania przeciwdrgawkowego. Chociaż receptory P2X7 wydają się pełnić istotne funkcje w procesie epileptogenezy, a związki będące ich antagonistami wykazują działanie ochronne w doświadczalnych modelach padaczki, to rola tych receptorów w procesie hamowania napadów padaczkowych nie wydaje się być znacząca. Uzyskane wyniki nie potwierdzają wcześniejszego przypuszczenia o możliwości zastosowania antagonistów receptora P2X7 jako leków przeciwpadaczkowych.
3. UA, który jest składnikiem diety człowieka i jest również stosowany jako suplement diety, wykazywał działanie przeciwdrgawkowe jedynie w testach drgawek indukowanych stymulacją elektryczną, tj. w teście MEST i drgawek psychomotorycznych indukowanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz

u myszy. Ze względu na ograniczone właściwości przeciwdrgawkowe, związek ten nie wydaje się być dobrym kandydatem do dalszych badań mających na celu poszukiwanie nowych, skuteczniejszych i bezpiecznych sposobów farmakoterapii zaburzeń padaczkowych.

4. PTE wykazywał działanie przeciwdrgawkowe w zastosowanych modelach drgawek padaczkowych u larw danio pręgowanego oraz u myszy. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania tego związku w terapii zaburzeń padaczkowych. Konieczne są jednak dalsze badania mające na celu poznanie dokładnego mechanizmu działania tego związku, a także sprawdzenie jego właściwości antyepileptogennych. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pozwalają również przypuszczać, że przyjmowanie PTE w formie suplementów diety lub jako składnika diety przez pacjentów z padaczką nie będzie miało niekorzystnego wpływu na występowanie napadów padaczkowych, co więcej nie powinno również niekorzystnie oddziaływać na koordynację ruchową oraz siłę mięśni szkieletowych.
5. Chociaż PTE wykazuje działanie przeciwdrgawkowe w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych u zwierząt, to może on wchodzić w niekorzystne interakcje o charakterze farmakokinetycznym z niektórymi lekami przeciwpadaczkowymi. Oprócz obserwowanego nasilenia aktywności przeciwdrgawkowej karbamazepiny i okskarbazepiny możliwe jest nasilenie dotychczasowych i/lub powstanie nowych działań niepożądanych, co będzie negatywnie wpływać na stan zdrowia pacjenta i może doprowadzić do przerwania podjętej wcześniej terapii. Możliwe są jednak również korzystne interakcje farmakodynamiczne między PTE i lekami przeciwpadaczkowymi, co zostało stwierdzone w przypadku klonazepamu.

Chociaż wyniki doświadczeń przeprowadzonych z zastosowaniem zwierzęcych modeli nie mogą być przeniesione bezpośrednio do praktyki klinicznej, to stanowią one istotną wskazówkę w procesie poszukiwania i opracowywania nowych sposobów terapii nie tylko zaburzeń padaczkowych, ale też innych typów schorzeń. Modele zwierzęce umożliwiają wstępną identyfikację związków o działaniu terapeutycznym, a także pozwalają na zbadanie mechanizmów ich działania. Szczególnie ważna w przypadku zaburzeń padaczkowych jest możliwość zbadania mechanizmu działania

badanych związków w tkance mózgowej, co nie jest możliwe do wykonania w praktyce klinicznej.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1 Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Jestem absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W roku 2001 uzyskałam tytuł zawodowy licencjata biologii na podstawie pracy licencjackiej pt. *„Typy torfowisk wysokich oraz udział komponentów sfagnowych w ich budowie”*, która została przygotowana w Zakładzie Systematyki Roślin. Pracę maderską pt. *„Analiza polipeptydów i białek humoralnej odpowiedzi immunologicznej u larw Galleria mellonella”* wykonałam w Zakładzie Immunologii Bezkęgowców pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Jakubowicz. Tytuł magistra biologii uzyskałam w roku 2003, a rok później (maj 2004 r.) rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, kierowanym przez prof. dr. hab. Piotra Wlazia.

Podjęte przeze mnie prace badawcze dotyczyły przede wszystkim zaburzeń padaczkowych i były one prowadzone z zastosowaniem doświadczalnych modeli drgawek padaczkowych u myszy i szczurów. Jednym z pierwszych realizowanych przeze mnie zadań badawczych było poznanie zmian wybranych parametrów stresu oksydacyjnego będących następstwem aktywności drgawkowej. W trakcie realizacji tego projektu współpracowałam z prof. dr hab. Martą Kankofer z Katedry Biochemii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały szereg wywołanych stymulacją elektryczną zmian markerów stresu oksydacyjnego w tkance mózgowej, surowicy oraz erytrocytach zwierząt doświadczalnych. Podprogowa stymulacja elektryczna, która nie powodowała wystąpienia drgawek tonicznych u myszy, nie wywoływała tak dużych i gwałtownych zmian aktywności peroksydazy glutationowej (GSH-Px) jak w przypadku zmian obserwowanych po drgawkach tonicznych. Stymulacja elektryczna, niezależnie od wystąpienia drgawek tonicznych, powodowała spadek poziomu peroksydacji lipidów, co mogło wynikać m.in. z wysokiej aktywności GSH-Px. Wyniki tych doświadczeń zostały szczegółowo opisane w publikacji **P3** (Załącznik 4).

W początkowym okresie pracy naukowo-badawczej współpracowałam również z prof. dr. hab. Waldemarem Turskim (Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie) w ramach realizacji dwóch grantów finansowanych przez Komitet Badań Naukowych, tj. „*Wpływ orfenadryny na pobudliwość drgawkową – nowy model drgawek*” (2 P05D 060 29) oraz „*Wpływ nowych leków przeciwpadaczkowych na drgawki i proces epileptogenezy w modelu pilokarpinowym*” (2 P05A 130 30). W trakcie realizacji tych projektów przeprowadziłam doświadczenia, których celem było wykonanie i analiza zapisu EEG ze struktur mózgowych szczurów, tj. hipokampa, ciała migdałowatego i kory mózgu. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na opisanie modelu drgawek orfenadrynowych u szczurów jako nowego modelu wtórnie uogólnionego stanu padaczkowego (*status epilepticus*), który może być wykorzystywany w badaniach przedklinicznych w procesie poznawania mechanizmów padaczkowych oraz poszukiwania nowych leków o działaniu przeciwdrgawkowym (publikacja **D6**). Doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem modelu pilokarpinowego, które zostały szczegółowo opisane w publikacji **D2**, wykazały skuteczność riluzolu oraz brak skuteczności topiramatu w hamowaniu drgawek wywołanych pilokarpiną u szczurów. Odmienne wyniki otrzymane w przypadku tych dwóch badanych leków wynikały prawdopodobnie z ich interakcji farmakokinetycznych z pilokarpiną, ponieważ riluzol powodował spadek stężenia pilokarpiny, a topiramat wzrost jej stężenia zarówno w osoczu, jak i w tkance mózgu u szczurów. Publikacje **D2** i **D6** ukazały się po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora.

We współpracy z prof. dr hab. Ewą Poleszak z Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego prowadziłam badania dotyczące m.in. aktywności magnezu w teście wymuszonego pływania u myszy. Moim zadaniem było przygotowanie próbek (tj. osocza oraz homogenatów mózgów) oraz oznaczenie w nich stężeń magnezu przy użyciu metody spektrofotometrycznej. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały właściwości przeciwdepresyjne magnezu oraz udział szlaku NMDA/kwasu glutaminowego w mechanizmie jego działania. Zostały one opisane w publikacjach **P1** i **P2**.

Brałam również udział w badaniach nad wpływem sarkozyny, która jest endogennym inhibitorem transporterów glicyny typu 1, na próg aktywności drgawkowej w teście *iv* PTZ oraz MEST u myszy. Wzrost stężenia glicyny, do którego

dochodzi w wyniku zablokowania jej transporterów, nasila aktywację receptorów NMDA, w wyniku czego może dochodzić do obniżenia progu pobudliwości drgawkowej. Wyniki przeprowadzonych przez nas doświadczeń nie potwierdziły wcześniejszych przypuszczeń, ponieważ sarkozyna nie wpływała w sposób istotny statystycznie na próg aktywności drgawkowej w teście *iv* PTZ, natomiast w teście MEST powodowała istotny statystycznie wzrost progu drgawek maksymalnych. Uzyskane wyniki pokazały, że stosowanie sarkozyny w leczeniu schizofrenii nie niesie ryzyka występowania napadów padaczkowych, natomiast stosowanie tego związku u pacjentów z padaczką wymaga dalszych dokładniejszych badań. Powyższe doświadczenia zostały szczegółowo opisane w publikacji **D5**.

Równolegle do opisanych powyżej doświadczeń prowadziłam badania mające na celu ocenę aktywności sildenafilu, selektywnego inhibitora fosfodiesterazy 5 (PDE5), w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych u myszy oraz w modelu drgawek rozniecanych (*kindling*) z ciała migdałowatego u szczurów. Część tych doświadczeń została sfinansowana z grantu Komitetu Badań Naukowych („*Wpływ sildenafilu na działanie klasycznych i nowych leków przeciwpadaczkowych w modelach napadów padaczkowych u myszy. Badania farmakodynamiczne i farmakokinetyczne*”, KBN N N401 224434, kierownik: prof. dr hab. Piotr Wlaź), a ich wyniki zostały szczegółowo opisane w mojej rozprawie doktorskiej oraz 5 oryginalnych artykułach naukowych (**D1, D3, D4, D10 i D13**), które zostały opublikowane po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora.

Badania dotyczące aktywności sildenafilu w doświadczalnych modelach drgawek i padaczki zostały podjęte w odpowiedzi na pojawiające się w literaturze naukowej informacje o możliwości prodrgawkowego działania tego związku. Ponadto, duża część mężczyzn cierpiących na padaczkę i przyjmujących leki przeciwpadaczkowe doświadcza współwystępowania zaburzeń funkcji seksualnych, w tym zaburzeń erekcji, które mogą być leczone z zastosowaniem właśnie sildenafilu. Związek ten jest powszechnie znany jako Viagra® (Pfizer), a obecnie dostępny również bez recepty. Celem badań było więc określenie bezpieczeństwa stosowania tego leku u pacjentów z padaczką.

Wyniki doświadczeń wykazały bardzo słabe działanie prodrgawkowe sildenafilu w teście *iv* PTZ oraz jego przeciwdrgawkowe działanie w teście MEST u myszy i w modelu drgawek rozniecanych z ciała migdałowatego u szczurów. W późniejszym okresie doświadczenia te zostały poszerzone o zbadanie wpływu sildenafilu na

aktywność wybranych leków przeciwpadaczkowych w testach MES oraz podskórnym (sc) i iv PTZ. Badany inhibitor PDE5 nasilał aktywność etosuksymidu w teście sc PTZ, karbamazepiny, kwasu walproinowego i topiramatu w teście MES oraz wigabatryny i gabapentyny w teście iv PTZ. W przypadku kombinacji sildenafilu z karbamazepiną i etosuksymidem zostało stwierdzone występowanie interakcji o charakterze farmakokinetycznym.

Doniesienia o rekreacyjnym zażywaniu sildenafilu, często w połączeniu z innymi związkami, m.in. z kokainą, skłoniły mnie do zbadania aktywności tego związku w teście drgawek kokainowych u myszy. Wyniki tego doświadczenia wykazały brak wpływu sildenafilu na aktywność drgawkową w teście drgawek kokainowych, na podstawie czego można przypuszczać, że nie będzie on zwiększał ryzyka występowania drgawek u osób przyjmujących go jednocześnie z kokainą.

Pracę doktorską pt. *„Wpływ sildenafilu na aktywność drgawkową w zwierzęcych modelach drgawek eksperymentalnych oraz jego interakcje z wybranymi lekami przeciwpadaczkowymi”*, przygotowaną pod kierunkiem prof. dr. hab. Piotra Wlazia, obroniłam 19 listopada 2008 r.

Podsumowanie dorobku naukowego przed uzyskaniem stopnia doktora

- Liczba publikacji znajdujących się w bazie JCR: **3**
- Łączny IF: **6,011** (wg roku publikacji)
- Łączna liczba punktów MNiSW: **50** (wg roku publikacji)

5.2 Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych kontynuowałam doświadczenia dotyczące działania sildenafilu i jego wpływu na aktywność leków przeciwpadaczkowych w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych u myszy. Kontynuacja tych doświadczeń związana była z końcowym etapem realizacji finansowanego przez Komitet Badań Naukowych grantu naukowego, o którym pisałam we wcześniejszej części niniejszego autoreferatu, a także z realizacją projektu Iuventus Plus finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (*„Wpływ sildenafilu na aktywność drgawkową oraz działanie wybranych leków przeciwpadaczkowych w modelu drgawek psychomotorycznych wywoływanych prądem*

elektrycznym o częstotliwości 6 Hz u myszy", IP 2011 038571), którego byłam kierownikiem. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych w ramach realizacji projektu Iuventus Plus zostały opublikowane w publikacji **D17**. Przeprowadzone doświadczenia wykazały istotny efekt przeciwdrgawkowy sildenafilu w teście drgawek psychomotorycznych. Co więcej, związek ten nasilał aktywność wszystkich badanych w tym teście leków przeciwpadaczkowych, tj. fenobarbitalu, kwasu walproinowego, klonazepamu, etosuksymidu, tiagabiny, okskarbazepiny i lewetiracetamu. Interakcje sildenafilu z kwasem walproinowym i lewetiracetamem miały charakter farmakokinetyczny, o czym świadczył wzrost stężenia tych leków przeciwpadaczkowych w surowicy i mózgach zwierząt doświadczalnych. Nasilenie aktywności przeciwdrgawkowej pozostałych leków było natomiast wynikiem interakcji farmakodynamicznych.

W związku z wykazaniem istotnych właściwości przeciwdrgawkowych sildenafilu w teście 6 Hz u myszy, badania te były kontynuowane w późniejszym czasie w celu poznania możliwych mechanizmów jego działania. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały udział neurotransmisji GABAergicznej, glutaminianergicznej, serotoninerdycznej i adenozykowej w przeciwdrgawkowym działaniu sildenafilu w teście 6 Hz. Nie wykazano natomiast udziału receptorów opioidowych μ . Powyższe doświadczenia zostały przedstawione w publikacji **D31**.

Badanie wpływu sildenafilu na funkcje centralnego układu nerwowego kontynuowałam uczestnicząc również w doświadczeniach prowadzonych przez dr Katarzynę Socąę. Badała ona właściwości przeciwddepresyjne tego związku oraz jego wpływ na aktywność leków przeciwddepresyjnych w teście wymuszonego pływania u myszy. Doświadczenia te wykazały przeciwddepresyjne właściwości sildenafilu po zablokowaniu muskarynowych receptorów cholinergicznych. Związek ten wpływał również na aktywność niektórych leków przeciwddepresyjnych – nasilał działanie amitryptyliny, wenlafaksyny, bupropionu, mianseryny i tianeptyny oraz osłabiał aktywność paroksetyny i magnezu. Nasilenie aktywności wenlafaksyny, bupropionu i tianeptyny przez sildenafil było prawdopodobnie wynikiem interakcji farmakokinetycznych. Wyniki powyższych doświadczeń zostały opisane w publikacjach **D9, D11, D12, D14 i D15**.

Badanie właściwości przeciwdepresyjnych sildenafilu było kontynuowane również w późniejszym okresie w ramach realizacji projektu Iuventus Plus pt. „*Ocena przeciwdepresyjnego działania sildenafilu (selektywnego inhibitora fosfodiesterazy 5) i jego wpływu na terapię przeciwdepresyjną u myszy*” (IP 2014 043373, kierownik: dr Katarzyna Socąła), a wyniki tych doświadczeń zostały szczegółowo opisane w publikacjach **D25** i **D26**. Wielokrotne podania sildenafilu powodowały jedynie niewielkie działanie przeciwdepresyjne w teście wymuszonego pływania u myszy. Ostre podania sildenafilu odwracały wywołane rezerpiną lub unieruchomieniem wydłużenie czasu bezruchu w tym teście oraz wzrost poziomu kortykosteronu we krwi zwierząt, zarówno tych poddanych stresowi unieruchomienia, jak i u tych, które nie były poddawane unieruchomieniu. Zaobserwowano występowanie interakcji farmakodynamicznych między sildenafilem i trzema badanymi lekami przeciwdepresyjnymi, tj. sertralina, trazodonem i maprotylina, a także interakcji farmakokinetycznych z citalopramem, fluwoksamina i agomelatyna. Co więcej, efekt terapii elektrowstrząsowej był osłabiany u zwierząt, którym podawano sildenafil przewlekłe.

W 2010 roku nawiązałam współpracę z dr hab. Mirosławem Czuczwarem z II Kliniki Anestezjologii i Intensywnej Terapii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Współpraca ta związana była z realizacją projektu pt. „*Wpływ hamowania neurogenezy we wczesnym okresie życia na epileptogenezę i zjawisko lekooporności u szczurów*” (Iuventus Plus, IP 2010 006870), a wyniki przeprowadzonych doświadczeń zostały zaprezentowane w formie doniesień zjazdowych. W ramach współpracy z prof. dr. hab. Maciejem Gąsiorem (Zakład Farmakologii i Fizjologii, Kolegium Medycznego Uniwersytetu Drexel w Filadelfii, USA) uczestniczyłam w doświadczeniach mających na celu zbadanie wpływu kwasu klawulanowego (inhibitor β -laktamazy), kwasu kaprylowego oraz kwasu dekanowego (składniki diety ketogennej) na aktywność drgawkową w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych u myszy (publikacje **D7**, **D8** i **D19**). Doświadczenia dotyczące kwasu kaprylowego zostały w późniejszym czasie poszerzone o zbadanie mechanizmu jego przeciwdrgawkowego działania w teście drgawek psychomotorycznych indukowanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz u myszy (publikacja **D20**). Doświadczenia realizowane we współpracy z zespołem prof. dr. hab. Jakuba Fichny z Zakładu Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi zaowocowały publikacją kolejnych trzech artykułów (publikacja **D16**, **D23** i **D24**), w

których opisane zostały wyniki doświadczeń mających na celu ocenę aktywności selektywnych antagonistów receptorów opioidowych μ , melatoniny i agonistów receptora melatoninowego (Neu-P11 i Neu-P67), a także wodnego wyciągu z *Calea zacatechichi* w mysich modelach drgawek padaczkowych.

Uczestniczyłam w doświadczeniach prowadzonych we współpracy z dr hab. Karoliną Pytką z Katedry Farmakodynamiki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, których celem było zbadanie przeciwdrgawkowych właściwości antagonistów receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}, 5-HT₇ i 5-HT₃, tj. HBK-14 i HBK-15, w doświadczalnych modelach drgawek padaczkowych u myszy. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały przeciwdrgawkowe właściwości HBK-14 we wszystkich trzech zastosowanych testach, tj. w teście MEST, drgawek psychomotorycznych indukowanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz oraz w teście *iv* PTZ u myszy. HBK-15 podnosił natomiast próg drgawkowy jedynie w testach drgawek indukowanych stymulacją elektryczną, tj. w teście MEST i drgawek psychomotorycznych. Badane związki nie wpływały na siłę mięśni szkieletowych oraz koordynację ruchową u myszy. Wyniki powyższych doświadczeń zostały szczegółowo opisane w publikacji **D28**.

W czasie swojej pracy w Zakładzie Fizjologii Zwierząt UMCS uczestniczyłam również w doświadczeniach prowadzonych przez dr Katarzynę Socałę, których celem było zbadanie wpływu wodnego ekstraktu z *Genoderma lucidum*, sulforafanu, α -spinasterolu, tadalafilu (selektywny inhibitor PDE5) i KA-11 (związek hybrydowy posiadający w swojej strukturze fragmenty cząsteczek etosuksymidu, lakoamidu i lewetiracetamu) na niektóre funkcje centralnego układu nerwowego. Wyniki tych doświadczeń wykazały brak wpływu wodnego ekstraktu z grzybni *G. lucidum* na próg aktywności drgawkowej w teście *iv* PTZ i MEST u myszy. Ekstrakt ten wykazywał natomiast działanie przeciwdrgawkowe w teście drgawek psychomotorycznych wywołanych stymulacją o częstotliwości 6 Hz. Stwierdzono również jego działanie przeciwdepresyjne w teście wymuszonego pływania oraz brak działania przeciwlękowego w teście podniesionego labiryntu krzyżowego u myszy. Powyższe wyniki zostały szczegółowo opisane w publikacji **D22**. Alfa-spinasterol – selektywny antagonist receptoru waniloidowego typu 1 (TRPV1), wykazywał istotne działanie przeciwdrgawkowe w trzech testach drgawek padaczkowych. Powodował wzrost progu

aktywności drgawkowej dla drgawek maksymalnych w teście MEST oraz drgawek psychomotorycznych wywołanych stymulacją elektryczną o częstotliwości 6 Hz, w teście *iv* PTZ podnosił próg dla drgawek mioklonicznych oraz klonicznych (publikacja **D21**).

Wyniki doświadczeń z sulforafanem nie potwierdziły wcześniejszych przypuszczeń o jego działaniu przeciwdrgawkowym, ponieważ związek ten powodował istotne obniżenie progu drgawkowego dla drgawek mioklonicznych i klonicznych w teście *iv* PTZ oraz dla drgawek psychomotorycznych, nie wpływał natomiast w sposób istotny statystycznie na próg drgawek tonicznych w teście *iv* PTZ i MEST. Co ciekawe, sulforafan nasilał aktywność przeciwdrgawkową karbamazepiny w teście MES. Interakcje te miały prawdopodobnie charakter farmakokinetyczny, ponieważ zaobserwowano wzrost stężenia tego leku przeciwpadaczkowego zarówno w osoczu, jak i w mózgach zwierząt doświadczalnych. W trakcie doświadczeń zaobserwowano również, że wysokie dawki sulforafanu mają działanie sedacyjne, powodują hypotermię, upośledzenie koordynacji ruchowej, osłabienie siły mięśni szkieletowych, a także wysoką śmiertelność myszy. W związku z działaniem prodrgawkowym oraz licznymi działaniami niepożądanymi zdecydowano się również na wyznaczenie dawki toksycznej TD_{50} oraz dawki letalnej LD_{50} tego związku. Wyniki powyższych doświadczeń zostały przedstawione w publikacji **D27**.

Doświadczenia oceniające aktywność tadalafilu wykazały, że obniża on próg dla drgawek mioklonicznych, ale nie wpływa na progi dla uogólnionych drgawek klonicznych oraz drgawek tonicznych w teście *iv* PTZ u myszy. Związek ten nie powodował zmian aktywności drgawkowej w teście MEST oraz 6 Hz. Tadalafil nie wpływał na aktywność karbamazepiny i topiramatu w teście MES oraz kwasu walproinowego i tiagabiny w teście drgawek psychomotorycznych, nasilał natomiast działanie klonazepamu i osłabiał działanie okskarbazepiny w teście *iv* PTZ. Można przypuszczać, że interakcje między tadalafilem a klonazepamem i okskarbazepiną miały charakter farmakodynamiczny, ponieważ nie zaobserwowano zmian stężenia tych leków przeciwpadaczkowych w osoczu i mózgu myszy. Szczegółowy opis wyników powyższych doświadczeń został przedstawiony w publikacji **D29**.

Badanie właściwości związku KA-11, który został zsyntetyzowany w Zakładzie Chemii Leków, Katedry Chemii Farmaceutycznej Collegium Medicum Uniwersytetu

Jagiellońskiego w Krakowie, zostało przeprowadzone z użyciem modelu drgawek rozniecanych (*kindling*) wywoływanych wielokrotnymi podaniami PTZ u myszy. Po zakończeniu procedury *kindlingu* ocenione zostały niektóre parametry behawioralne oraz próg aktywności drgawkowej u zwierząt. KA-11 w sposób istotny statystycznie hamował rozwój drgawek padaczkowych w modelu drgawek rozniecanych, co wskazuje na jego właściwości antyepileptogenne. Powodował również obniżenie progu drgawek mioklonicznych i uogólnionych drgawek tonicznych w teście *iv* PTZ u myszy poddanych procedurze *kindlingu*, natomiast jego ostre podania u zwierząt, które nie przeszły tej procedury, nie wpływały na próg drgawkowy w tym teście. Dodatkowo, KA-11 znosił częściowo prodepresyjne działanie wielokrotnych podań PTZ u myszy, nie wpływał natomiast na zachowania lękowe. Nie odnotowano istotnych statystycznie zmian aktywności lokomotorycznej u badanych zwierząt. Opisane doświadczenia zostały szczegółowo opisane w publikacji **D30**.

W latach 2011–2018 byłam sześciokrotnie nagradzana zespołową Nagrodą Rektora za cykl publikacji naukowych. W roku 2013 otrzymałam stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

Podsumowanie dorobku naukowego po osiągnięciu stopnia doktora (z wyłączeniem publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe)

- Liczba publikacji znajdujących się w bazie JCR: **31**
- Łączny IF: **94,206** (wg roku publikacji)
- Łączna liczba punktów MNiSW: **883** (wg roku publikacji)

6. Podsumowanie całego dorobku naukowego

- Łączna liczba publikacji znajdujących się w bazie JCR: **39**
- Łączny IF: **115,408**
- Łączna liczba punktów MNiSW: **1053**
- Liczba cytowań publikacji według bazy *Web of Science*: **386**
- Liczba cytowań publikacji bez autocytowań według bazy *Web of Science*: **304**
- Indeks Hirscha według bazy *Web of Science*: **11**
- Referaty wygłoszone na krajowych konferencjach tematycznych: **3**
- Liczba komunikatów zjazdowych: **27**, w tym:
 - z konferencji krajowych: **6**

- z konferencji międzynarodowych: **21**
- Liczba projektów badawczych: **7**, w tym:
 - kierownik projektu: **1**
 - wykonawca: **6**

Piśmiennictwo

1. Moshe SL, Perucca E, Ryvlin P, Tomson T. (2015) Epilepsy: new advances. *Lancet*. 385:884-898.
2. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. (2019) Epilepsy in adults. *Lancet*. 393:689-701.
3. Campos G, Fortuna A, Falcao A, Alves G. (2018) In vitro and in vivo experimental models employed in the discovery and development of antiepileptic drugs for pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsy Res*. 146:63-86.
4. Wahab A. (2010) Difficulties in treatment and management of epilepsy and challenges in new drug development. *Pharmaceuticals (Basel)*. 3:2090-2110.
5. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Jr., Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshe SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. (2014) ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 55:475-482.
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. Scharfman HE. (2007) The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 7:348-354.
8. Lasoń W, Dudra-Jastrzębska M, Rejda K, Czuczwar SJ. (2011) Basic mechanisms of antiepileptic drugs and their pharmacokinetic/pharmacodynamic interactions: an update. *Pharmacol Rep*. 63:271-292.
9. Kwan P, Brodie MJ. (2000) Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med*. 342:314-319.
10. Kwan P, Arzimanoglou A, Berg AT, Brodie MJ, Allen HW, Mathern G, Moshe SL, Perucca E, Wiebe S, French J. (2010) Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*. 51:1069-1077.
11. Löscher W. (2009) Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *Eur J Pharmacol*. 610:1-11.
12. Löscher W. (2016) Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. *Epilepsy Res*. 126:157-84.
13. Afrikanova T, Serruys AS, Buenafe OE, Clinckers R, Smolders I, de Witte PA, Crawford AD, Esguerra CV. (2013) Validation of the zebrafish pentylenetetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS One*. 8:e54166.
14. Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H. (2005) Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience*. 131:759-768.
15. Meldrum B. (2002) Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy Res*. 50:33-40.
16. White, H.S. 1998. Chemoconvulsants w: Peterson, S.L., Albertson, T.E. (red.), *Neuropharmacology Methods in Epilepsy Research*, CRC Press, Boca Raton FL, strony 27-40.

17. Castel-Branco MM, Alves GL, Figueiredo IV, Falcao AC, Caramona MM. (2009) The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 31:101-106.
18. 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.
19. Barton ME, Peters SC, Shannon HE. (2003) Comparison of the effect of glutamate receptor modulators in the 6 Hz and maximal electroshock seizure models. *Epilepsy Res.* 56:17-26.
20. Terao J, Murota K, Kawai Y. (2011) Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food Funct.* 2:11-17.
21. Yang CY, Hsiu SL, Wen KC, Lin SP, Tsai SY, Hou YC, Chao PDL. (2005) Bioavailability and metabolic pharmacokinetics of rutin and quercetin in rats. *J Food Drug Anal.* 13:244-250.
22. Fernandez SP, Wasowski C, Loscalzo LM, Granger RE, Johnston GA, Paladini AC, Marder M. (2006) Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur J Pharmacol.* 539:168-176.
23. Jager AK, Saaby L. (2011) Flavonoids and the CNS. *Molecules.* 16:1471-1485.
24. Baluchnejadmojarad T, Roghani M., Homayounfar H. (2010) Inhibitory effect of high dose of the flavonoid quercetin on amygdala electrical kindling in rats. *Basic Clinl Neurosci.* 1:57-61.
25. Joshi D, Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK. (2005) Protective effect of quercetin on alcohol abstinence-induced anxiety and convulsions. *J Med Food.* 8:392-396.
26. Nassiri-Asl M, Shariati-Rad S, Zamansoltani F. (2008) Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32:989-993.
27. Nassiri-Asl M, Mortazavi SR, Samiee-Rad F, Zangivand AA, Safdari F, Saroukhani S, Abbasi E. (2010) The effects of rutin on the development of pentylenetetrazole kindling and memory retrieval in rats. *Epilepsy Behav.* 18:50-53.
28. Nassiri-Asl M, Zamansoltani F, Javadi A, Ganjvar M. (2010) The effects of rutin on a passive avoidance test in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 34:204-207.
29. Nassiri-Asl M, Moghbelinejad S, Abbasi E, Yonesi F, Haghighi MR, Lotfizadeh M, Bazahang P. (2013) Effects of quercetin on oxidative stress and memory retrieval in kindled rats. *Epilepsy Behav.* 28:151-155.
30. Tongjaroenbuangam W, Ruksee N, Chantiratikul P, Pakdeenarong N, Kongbuntad W, Govitrapong P. (2011) Neuroprotective effects of quercetin, rutin and okra (*Abelmoschus esculentus* Linn.) in dexamethasone-treated mice. *Neurochem Int.* 59:677-685.
31. Herrera-Ruiz M, Zamilpa A, Gonzalez-Cortazar M, Reyes-Chilpa R, Leon E, Garcia MP, Tortoriello J, Huerta-Reyes M. (2011) Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytomedicine.* 18:1255-1261.
32. Machado DG, Bettio LE, Cunha MP, Santos AR, Pizzolatti MG, Brighente IM, Rodrigues AL. (2008) Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol.* 587:163-168.
33. Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A. (2000) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol.* 58:82-88.
34. Cieślak M, Wojtczak A, Komoszynski M. (2017) Role of the purinergic signaling in epilepsy. *Pharmacol Rep.* 69:130-138.
35. Engel T, Jimenez-Pacheco A, Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M, Henshall DC. (2012) P2X7 receptor in epilepsy; role in pathophysiology and potential targeting for seizure control. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 4:174-187.

-
36. Engel T, Gomez-Villafuertes R, Tanaka K, Mesuret G, Sanz-Rodriguez A, Garcia-Huerta P, Miras-Portugal MT, Henshall DC, Diaz-Hernandez M. (2012) Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *FASEB J.* 26:1616-1628.
 37. Skaper SD, Debetto P, Giusti P. (2010) The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J.* 24:337-345.
 38. Sperlagh B, Illes P. (2014) P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 35:537-547.
 39. Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP. (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch.* 452:513-537.
 40. Amhaoul H, Ali I, Mola M, Van EA, Szewczyk K, Missault S, Bielen K, Kumar-Singh S, Rech J, Lord B, Ceusters M, Bhattacharya A, Dedeurwaerdere S. (2016) P2X7 receptor antagonism reduces the severity of spontaneous seizures in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology.* 105:175-85.
 41. Jimenez-Pacheco A, Mesuret G, Sanz-Rodriguez A, Tanaka K, Mooney C, Conroy R, Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M, Henshall DC, Engel T. (2013) Increased neocortical expression of the P2X7 receptor after status epilepticus and anticonvulsant effect of P2X7 receptor antagonist A-438079. *Epilepsia.* 54:1551-1561.
 42. Jimenez-Pacheco A, Diaz-Hernandez M, Arribas-Blazquez M, Sanz-Rodriguez A, Olivos-Ore LA, Artalejo AR, Alves M, Letavic M, Miras-Portugal MT, Conroy RM, Delanty N, Farrell MA, O'Brien DF, Bhattacharya A, Engel T, Henshall DC. (2016) Transient P2X7 receptor antagonism produces lasting reductions in spontaneous seizures and gliosis in experimental temporal lobe epilepsy. *J Neurosci.* 36:5920-5932.
 43. Chen H, Gao Y, Wang A, Zhou X, Zheng Y, Zhou J. (2015) Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents. *Eur J Med Chem.* 92:648-55.
 44. Kashyap D, Tuli HS, Sharma AK. (2016) Ursolic acid (UA): a metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci.* 146:201-13.
 45. Colla AR, Oliveira A, Pazini FL, Rosa JM, Manosso LM, Cunha MP, Rodrigues AL. (2014) Serotonergic and noradrenergic systems are implicated in the antidepressant-like effect of ursolic acid in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 124:108-16.
 46. Machado DG, Neis VB, Balen GO, Colla A, Cunha MP, Dalmarco JB, Pizzolatti MG, Prediger RD, Rodrigues AL. (2012) Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: evidence for the involvement of the dopaminergic system. *Pharmacol Biochem Behav.* 103:204-211.
 47. Ramos-Hryb AB, Cunha MP, Pazini FL, Lieberknecht V, Prediger RD, Kaster MP, Rodrigues AL. (2017) Ursolic acid affords antidepressant-like effects in mice through the activation of PKA, PKC, CAMK-II and MEK1/2. *Pharmacol Rep.* 69:1240-1246.
 48. Kazmi I, Afzal M, Gupta G, Anwar F. (2012) Antiepileptic potential of ursolic acid stearyl glucoside by GABA receptor stimulation. *CNS Neurosci Ther.* 18:799-800.
 49. Taviano MF, Miceli N, Monforte MT, Tzakou O, Galati EM. (2007) Ursolic acid plays a role in *Nepeta sibthorpii* Benth CNS depressing effects. *Phytother Res.* 21:382-385.
 50. Colla AR, Rosa JM, Cunha MP, Rodrigues AL. (2015) Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. *Eur J Pharmacol.* 758:171-6.
 51. Kazmi I, Gupta G, Afzal M, Rahman M, Anwar F. (2012) Pharmacological evaluation of anxiolytic activity of ursolic acid stearyl glucoside isolated from *Lantana camara*. *CNS Neurosci Ther.* 18:707-708.
 52. Khan I, Karim N, Ahmad W, Abdelhalim A, Chebib M. (2016) GABA-A receptor modulation and anticonvulsant, anxiolytic, and antidepressant activities of constituents from *Artemisia indica* Linn. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016:1215393.
-

53. Jeon SJ, Park HJ, Gao Q, Pena IJ, Park SJ, Lee HE, Woo H, Kim HJ, Cheong JH, Hong E, Ryu JH. (2015) Ursolic acid enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABAergic neurotransmission in mice. *Eur J Pharmacol.* 762:443-8.
54. Chang J, Rimando A, Pallas M, Camins A, Porquet D, Reeves J, Shukitt-Hale B, Smith MA, Joseph JA, Casadesus G. (2012) Low-dose pterostilbene, but not resveratrol, is a potent neuromodulator in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 33:2062-2071.
55. Azzolini M, La SM, Mattarei A, Paradisi C, Zoratti M, Biasutto L. (2014) Pharmacokinetics and tissue distribution of pterostilbene in the rat. *Mol Nutr Food Res.* 58:2122-2132.
56. Kosuru R, Rai U, Prakash S, Singh A, Singh S. (2016) Promising therapeutic potential of pterostilbene and its mechanistic insight based on preclinical evidence. *Eur J Pharmacol.* 789:229-243.
57. Al Rahim M, Rimando AM, Silistreli K, El-Alfy AT. (2013) Anxiolytic action of pterostilbene: involvement of hippocampal ERK phosphorylation. *Planta Med.* 79:723-730.
58. Poulose SM, Thangthaeng N, Miller MG, Shukitt-Hale B. (2015) Effects of pterostilbene and resveratrol on brain and behavior. *Neurochem Int.* 89:227-33.
59. Amany NI, Anjuman G.M. (2014) Anticonvulsant effect of resveratrol against pentylenetetrazole induced-epilepsy in rats: role of nitric oxide. *Int J Clin Pharmacol Res.* 4:133-138.
60. Gupta YK, Chaudhary G, Srivastava AK. (2002) Protective effect of resveratrol against pentylenetetrazole-induced seizures and its modulation by an adenosinergic system. *Pharmacology.* 65:170-174.
61. Tomaciello F, Leclercq K, Kaminski RM. (2016) Resveratrol lacks protective activity against acute seizures in mouse models. *Neurosci Lett.* 632:199-203.

Dieocrylu