

## Streszczenie rozprawy doktorskiej

Autor pracy: mgr Mateusz Pieróg

Temat pracy: *Wpływ wybranych leków przeciwpadaczkowych na aktywność drgawkową w eksperymentalnym modelu drgawek u dorosłego danio pręgowanego*

Promotor pracy: prof. dr hab. Piotr Wlaź

Promotor pomocniczy pracy: dr hab. Katarzyna Socała

Padaczka jest jedną z najczęstszych chorób neurodegeneracyjnych, charakteryzującą się tendencją do nieprovokowanych, nawracających napadów padaczkowych. Uważa się, że jej przyczyną są zaburzenia równowagi między układami pobudzającymi a hamującymi w OUN. Na całym świecie liczba osób chorych na to schorzenie może wynosić nawet 65 milionów. Celem terapii przeciwpadaczkowej jest osiągnięcie jak najlepszej kontroli napadów, przy możliwie najslabszych działaniach niepożądanych. Obserwacje kliniczne wskazują, że pomimo dostępności szerokiego spektrum leków przeciwpadaczkowych (LPP), około 30% pacjentów z padaczką stosujących leczenie farmakologiczne nie zostaje uwolnionych od napadów padaczkowych. Z drugiej strony, u wielu z nich odpowiednio ułożona politerapia przynosi poprawę kontroli napadów. Niestety liczne działania niepożądane LPP są jedną z głównych przyczyn zaprzestania ich stosowania przez pacjentów. Pomimo znaczącego postępu technologii oraz rozwoju branży farmaceutycznej nadal nie dysponujemy idealnym LPP, a te dostępne pozwalają jedynie na leczenie objawów padaczki, a nie przyczyn choroby. Istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań nad opracowaniem nowych LPP mogących zapobiegać rozwojowi choroby, których stosowanie nie powodowałoby uciążliwych efektów niepożądanych. W poszukiwaniach tych leków użytecznym może być organizm modelowy, jakim jest danio pręgowane.

Danio to gatunek ryb akwariowych, który w ostatnich latach stał się bardzo popularnym organizmem wykorzystywanym w farmakologii i neurobiologii. Przeprowadzone na nim badania behawioralne pozwalają na analizę działania różnych substancji na OUN danio, jak również dają możliwość wykazania ich ewentualnych efektów niepożądanych. Metoda wywoływania napadów drgawkowych u danio poprzez zanurzenie w roztworze PTZ pozwala na ocenę właściwości przeciwdrgawkowych testowanych substancji. Stosując właściwy system punktowania oraz pomiary czasowe kolejnych stadiów napadu, średni wynik badań dla grup eksperymentalnych stanowi istotny wskaźnik obrazujący nasilenie bądź



osłabienie drgawek po podaniu badanej substancji. Wśród wielu zalet tego gatunku zwierząt laboratoryjnych, wymieniane są również niewielkie rozmiary oraz niskie koszty ich utrzymania. Ponadto przeprowadzone z ich udziałem badania często wymagają użycia niewielkich ilości odczynników.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu wybranych LPP podanych dootrzewnowo (*i.p.*) na aktywność drgawkową w doświadczalnym modelu drgawkowym indukowanym zanurzeniem dorosłego danio w roztworze PTZ. Spośród klasycznych leków przeciwpadaczkowych wybrano VPA, PHT, CBZ, DZP, PB, natomiast spośród leków nowej generacji zastosowano LTG, TPM, FBM, LEV. Pierwszym zadaniem było wyznaczenie czasu ich maksymalnego działania oraz wyznaczenie dawek skutecznych leków w tym konkretnym modelu doświadczalnym. Kolejnym celem była ocena testowanych LPP pod kątem występowania działań niepożądanych u ryb z wykorzystaniem komory pomiarowej oraz oprogramowania analizującego behavior dorosłych osobników. Zbadano ich wpływ na aktywność ruchową oraz zachowania lękowe u tych ryb. Dodatkowo oznaczono stężenia poszczególnych leków w homogenatach całych danio. Wyniki te porównano z danymi z piśmiennictwa naukowego, w szczególności z odpowiednimi oznaczeniami stężeń LPP w mózgach gryzoni.

Wykorzystując zmodyfikowany system oceny drgawek pentetrazolowych u danio dla każdego LPP wyznaczono czas maksymalnego jego działania po podaniu *i.p.* Dla VPA było to 5 min, PHT – 60 min, CBZ – 30 min, DZP – 60 min, PB – 60 min, LTG – 60 min, TPM – 60 min, FBM – 60 min, LEV – 45 min.

VPA podany w zakresie dawek 75-200 mg/kg powodował istotne statystycznie wydłużenie latencji SI napadu drgawkowego. Dla SII podobny efekt zaobserwowano w zakresie 100-200 mg/kg, a dla SIII jedynie przy dawce 200 mg/kg. PHT w zakresie dawek 10-30 mg/kg powodowała istotne statystycznie wydłużenie latencji SI drgawek. Dla SII podobny efekt zaobserwowano wobec dawek 15 i 30 mg/kg. Niższą skuteczność przeciwdrgawkową zaobserwowano w przypadku CBZ, gdzie jedynie dawka 50 mg/kg spowodowała istotne statystycznie wydłużenie latencji SII i SIII napadu drgawkowego. DZP w dawce 1 i 2 mg/kg istotnie opóźnił SI napadu drgawkowego. W przypadku SII i SIII podobny efekt zaobserwowano jedynie przy dawce 2 mg/kg. PB w zakresie dawek 5-20 mg/kg powodował istotne statystycznie wydłużenie latencji SI drgawek. W przypadku SII i SIII podobne wydłużenie latencji zaobserwowano jedynie przy dawce 20 mg/kg. LTG w zakresie dawek 8-15 mg/kg powodowała istotne statystycznie wydłużenie latencji wszystkich faz napadu drgawkowego wywoływanych zanurzeniem w PTZ. Wszystkie użyte



dawki TPM opóźniły napad drgawkowy jedynie dla SI drgawek u ryb. Dla SII i SIII podobny efekt zaobserwowano w zakresie 20-50 mg/kg. FBM podawany w dawkach 30 i 60 mg/kg opóźnił jedynie SI napadu drgawkowego. LEV w zakresie dawek 10-30 mg/kg w sposób istotny statystycznie wydłużył latencję SI napadu drgawkowego. Podobny efekt zaobserwowano wobec dawek 15 i 30 mg/kg dla SII i SIII.

Analiza wyników aktywności ruchowej u danio po podaniu klasycznych i nowych LPP wykazała istotny statystycznie spadek tej aktywności u ryb po DZP i TPM.

Wyniki testów oceniających wpływ badanych LPP na zachowania lękowe u danio wykazały, że po stymulacji światłem z wykorzystaniem kombinacji kolorów czerwony/żółty działanie anksjolityczne wobec awersyjnej barwy żółtej występowało po podaniu PB, FBM, TPM, PHT. Niewielki efekt przeciwlękowy zaobserwowano w przypadku pojedynczych dawek VPA, DZP i LEV.

Rezultaty oznaczeń biochemicznych wykonanych metodą HPLC w homogenatach całych ryb wykazały, jakie średnie stężenie leków utrzymywało się w organizmie ryb w czasie ich maksymalnego działania. Istnieje prawdopodobieństwo, że różnice w wielkości stężeń niektórych leków w organizmach gryzoni i danio mogą wynikać z szybszego przebiegu procesów ich eliminacji przez nerki oraz skrzela u ryb.

Podsumowując, uzyskane wyniki pokazują, że badane LPP wykazują różną skuteczność przeciwdrgawkową w kolejnych stadiach napadu drgawkowego inicjowanego PTZ u dorosłych danio. Ponadto wykorzystana w doświadczeniu metodyka pozwoliła na rejestrację działań niepożądanych niektórych LPP u ryb. Zaprezentowane w niniejszej pracy doświadczenia stanowiły próbę wyznaczenia standardowych procedur, których stosowanie mogłoby ułatwić prowadzenie badań podstawowych nad padaczką z wykorzystaniem zwierzęcego modelu laboratoryjnego innego niż gryzonie

Mateusz Piesdag