

Załącznik 3

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM



Autoreferat przedstawiający opis osiągnięć naukowych

Karolina Pytka

Katedra Farmakodynamiki

Wydział Farmaceutyczny

Kraków 2017

Spis treści

1. Imię i Nazwisko	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	2
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	2
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.)	3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	3
4.3. Prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji	5
4.3.1. Wprowadzenie	5
4.3.2. Cel pracy	10
4.3.3. Wyniki badań i dyskusja	12
4.3.4. Podsumowanie	22
4.3.5. Piśmiennictwo	24
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	31
5.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora	31
5.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora	33
5.3. Podsumowanie całego dorobku naukowego	38

1. Imię i Nazwisko

Karolina Pytka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2013 **doktor nauk farmaceutycznych** - Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Potencjalna aktywność przeciwdepresyjna w grupie pochodnych piperazyny”

Promotor: prof. dr hab. Barbara Filipek

2009 **magister farmacji** - Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Tytuł pracy magisterskiej: „Aktywność miejscowo-znieczulająca amidowych analogów lignokainy”

Promotor: dr hab. Tadeusz Librowski, prof. UJ

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2014-obecnie **adiunkt** - Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

2010-2014 **asystent** - Katedra Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

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.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Aktywność przeciwdepresyjna, przeciwłękowa i prokognitywna nowego antagonisty receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}/5-HT₇/5-HT₃”

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

H1. Pytka K, Gawlik K, Pawlica-Gosiewska D, Witalis J, Waszkielewicz A. HBK-14 and HBK-15 with antidepressant-like and/or memory-enhancing properties increase serotonin levels in the hippocampus after chronic treatment in mice. *Metabolic Brain Disease*. 2017, 32:547-556.

(Springer; IF₂₀₁₆ = 2,297; MNiSW₂₀₁₆ = 20 pkt)

H2. Pytka K, Głuch-Lutwin M, Kotańska M, Waszkielewicz A, Kij A, Walczak M. Single administration of HBK-15-a triple 5-HT_{1A}, 5-HT₇, and 5-HT₃ receptor antagonist-reverses depressive-like behaviors in mouse model of depression induced by corticosterone. *Molecular Neurobiology*. 2017 May 26. doi: 10.1007/s12035-017-0605-4.

(Springer; IF₂₀₁₆ = 6,190; MNiSW₂₀₁₆ = 40 pkt)

H3. **Pytka K**, Głuch-Lutwin M, Kotańska M, Żmudzka E, Jakubczyk M, Waszkielewicz A, Janiszewska P, Walczak M. HBK-15 protects mice from stress-induced behavioral disturbances and changes in corticosterone, BDNF, and NGF levels. *Behavioural Brain Research*. 2017, 333:54-66.

(Elsevier; IF₂₀₁₆ = 3,002; MNiSW₂₀₁₆ = 30 pkt)

H4. **Pytka K**, Socala K, Rapacz A, Nieoczym D, Pieróg M, Gryboś A, Siwek A, Waszkielewicz A, Wlaź P. HBK-14 and HBK-15, triple 5-HT_{1A}, 5-HT₇ and 5-HT₃ antagonists with potent antidepressant- and anxiolytic-like properties, increase seizure threshold in various seizure tests in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2017, 79:378-385.

(Elsevier; IF₂₀₁₆ = 4,187; MNiSW₂₀₁₆ = 35 pkt)

H5. **Pytka K**, Głuch-Lutwin M, Knutelska J, Jakubczyk M, Waszkielewicz A, Kotańska M. HBK-14 and HBK-15 do not influence blood pressure, lipid profile, glucose level, or liver enzymes activity after chronic treatment in rats. *PLoS One*. 2016, 11:e0165495.

(PLoS One; IF₂₀₁₆ = 2,806; MNiSW₂₀₁₆ = 35 pkt)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania *impact factor* publikacji stanowiących podstawę habilitacji wynosi IF = **18,482**, co odpowiada punktacji MNiSW = **160**.

We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, a mój średni procentowy udział w prezentowanych publikacjach wynosi **72%**.

4.3. Prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji

4.3.1. Wprowadzenie

Zaburzenia depresyjne dotyczą miliony ludzi na całym świecie. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia na depresję choruje obecnie ponad 300 milionów osób [1]. Niestety, około 30% pacjentów nie odpowiada na dostępną farmakoterapię [2]. Ponadto ogromnym problemem jest opóźnione działanie leków przeciwdepresyjnych. Zauważalne efekty kliniczne pojawiają się dopiero po kilku tygodniach stosowania leku. Opóźnione działanie najczęściej tłumaczy się koniecznością zajścia zmian adaptacyjnych w obrębie mechanizmów neuronalnych w ośrodkowym układzie nerwowym (szczegółowo omówione przez Harmer et al. [3]). Fenomenem, jeśli chodzi o szybkość pojawienia się efektu przeciwdepresyjnego, jest ketamina, lek stosowany w anestezjologii, której efekty kliniczne można zaobserwować już po kilku godzinach od podania [4]. Dokładny mechanizm działania leku nie jest do końca poznany. Wiadomo natomiast, że w przeciwieństwie do leków przeciwdepresyjnych, ketamina powoduje m.in. szybki wzrost poziomu neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) [5]. Co więcej, BDNF ma kluczowe znaczenie w mechanizmie działania leku. Wykazano bowiem, że u myszy genetycznie pozbawionych BDNF nie obserwuje się szybkiego efektu przeciwdepresyjnego ketaminy [5]. Niestety, z powodu dużego ryzyka wystąpienia halucynacji, stanów splątania, pobudzenia czy irracjonalnych zachowań, możliwości zastosowania ketaminy w leczeniu zaburzeń depresyjnych są bardzo ograniczone. Istotne jest więc poszukiwanie nowych związków, które będą charakteryzowały się równie szybkim działaniem, lecz będą pozbawione działań niepożądanych.

Kolejnym problemem związanym z terapią zaburzeń depresyjnych jest niewątpliwie ich współwystępowanie z innymi chorobami, w tym szczególnie z zaburzeniami lękowymi [6]. Badania wskazują, że lęk należy do objawów, które najczęściej towarzyszą depresji [7]. Współwystępowanie zaburzeń lękowych wiąże się m.in. z nasileniem poczucia winy czy niskiego poczucia własnej wartości chorego, co zwiększa ryzyko przerwania leczenia i podjęcia próby samobójczej [8, 9]. Ponadto wiele badań sugeruje, że występowanie zaburzeń lękowych u chorujących na depresję jest jedną z przyczyn oporności na leczenie [10]. Biorąc to pod uwagę, cechą pożądaną w przypadku związków o działaniu przeciwdepresyjnym, jest dodatkowe działanie przeciwlękowe.

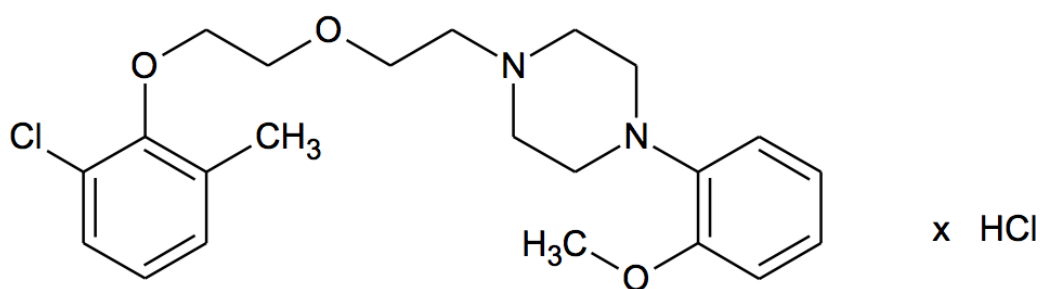
Poza dobrze zdefiniowanymi objawami depresyjnymi oraz zaburzeniami lękowymi, u chorych diagnozowane są deficyty poznawcze [11]. Badania kliniczne udowodniły, że stopień upośledzenia funkcji poznawczych ma bezpośredni związek z wiekiem (u starszych osób zaburzenia są nasilone) oraz stopniem zaawansowania depresji [12]. U chorych po pierwszym epizodzie depresyjnym najczęściej pojawiały zaburzenia sprawności psychomotorycznej, uwagi, uczenia się, pamięci wzrokowej oraz funkcji wykonawczych [13]. U pacjentów w fazie remisji następowała pewna poprawa, szczególnie w zadaniach wymagających uwagi, lecz nie osiągnęli oni poziomu sprawności zdrowych osób kontrolnych [13]. Wyniki badań wykorzystujących metody neuroobrazowania, jednoznacznie wskazują, że wraz ze wzrostem ilości epizodów depresyjnych oraz czasem trwania choroby, pogłębia się atrofia hipokampa, który pełni niezwykle istotną rolę w procesach poznawczych [14]. Co ciekawe, pomimo pewnej poprawy w zakresie elastyczności poznawczej, stosowanie leków przeciwdepresyjnych wiązało się z pogorszeniem uczenia werbalnego oraz pamięci [15]. Warto zauważyć, że spośród obecnie dostępnych leków, jedynie wortioksetyna posiada umiarkowane działanie prokognitywne [16]. Ponadto istotny jest również problem zaburzeń nastroju występujących we wczesnym stadium demencji (70 – 90% chorych) [17]. Depresja pojawia się najczęściej w zespołach otępiennych o nieznacznym nasileniu (20 – 40%) i manifestuje się drażliwością, labilnością emocjonalną lub dysforią [18]. W związku z tym istnieje ogromna potrzeba znalezienia nowych leków, które mogłyby odwrócić deficyty poznawcze u chorych na depresję, a także leczyć zaburzenia depresyjne towarzyszące demencji.

Zaburzenia depresyjne mogą występować samodzielnie, ale także pojawiać się w przebiegu innych schorzeń ośrodkowego układu nerwowego. Badania udowodniły, że depresja jest najczęstszym zaburzeniem psychicznym rozpoznawanym u pacjentów z padaczką [19]. Wykazano, że około 30% pacjentów cierpiących na epilepsję w trakcie swojego życia zachoruje na depresję [20]. Niestety, większość obecnie stosowanych leków przeciwdepresyjnych obniża próg drgawkowy, co istotnie zwiększa ryzyko wystąpienia napadów padaczkowych [21]. Mechanizm tego zjawiska nie jest jasny, lecz może mieć pewien związek z modulacją transmisji serotoninerгіcznej [22]. Współwystępowanie padaczki z zaburzeniami depresyjnymi, stawia zatem dodatkowe wymagania potencjalnym lekom. Istotne jest więc szukanie nowych substancji o właściwościach przeciwdepresyjnych, które jednocześnie nie będą wykazywały działania prodrгawkowego.

Jak wspomniano wyżej, mechanizm działania leków przeciwdepresyjnych nie został do końca poznany. Mimo że wiele układów neuroprzekaźnikowych bierze udział w efekcie przeciwdepresyjnym [23–25], zdecydowana większość dostępnych leków wchodzi w interakcję z układem serotonergicznym. W związku z tym receptory serotoninowe stanowią interesujący punkt uchwytu dla potencjalnych leków przeciwdepresyjnych. Udowodniono, że z wyjątkiem podtypu 5-HT₅, którego rola w zaburzeniach nastroju nie jest jeszcze określona, większość receptorów dla serotoniny bierze udział w działaniu przeciwdepresyjnym [24].

Z uwagi na lokalizację i funkcje regulacyjne receptory 5-HT_{1A} odgrywają kluczową rolę w zaburzeniach nastroju. Aktywacja presynaptycznych autoreceptorów 5-HT_{1A} w jądrze szwu (gdzie zlokalizowane są ciała neuronów serotoninowych), powoduje zahamowanie transmisji serotonergiczej. Z kolei pobudzenie receptorów postsynaptycznych zlokalizowanych w limbicznych i korowych częściach mózgu, reguluje uwalnianie innych neuroprzekaźników (np. kwasu γ -aminomasłowego lub L-glutaminowego) [26, 27]. Badania *post mortem* wykazały wzrost liczby autoreceptorów 5-HT_{1A} w śródmózgowiu samobójców [28]. Podobnie, myszy pozbawione funkcjonalnego receptora 5-HT_{1A} wykazywały krótszy (w porównaniu z grupą kontrolną) czas bezruchu w teście wymuszonego pływania oraz teście zawieszania za ogon [29, 30], czyli efekt jaki powoduje podanie leków przeciwdepresyjnych. Co ciekawe, Richardson-Jones i współpracownicy wykazali, że zmniejszenie poziomu autoreceptora 5-HT_{1A} u myszy przed podaniem selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny może przyspieszyć i zwiększyć efektywność terapii przeciwdepresyjnej [31].

Podobne wnioski, lecz dotyczące receptorów 5-HT₇, wyciągnęli Mnie-Filali i współpracownicy. Naukowcy wykazali, że podawanie SB-269970 (selektywnego antagonisty receptora 5-HT₇) przez zaledwie 1 tydzień, powodowało zmiany behawioralne, elektrofizjologiczne i neuroanatomiczne, które zwykle występują po długotrwałym leczeniu selektywnymi inhibitorami wychwytu zwrotnego serotoniny [32]. Badacze wysnuli więc wniosek, że antagoniści receptora 5-HT₇ mogą reprezentować nową klasę leków przeciwdepresyjnych o szybszym działaniu terapeutycznym. Potencjał przeciwdepresyjny antagonistów receptora 5-HT₇ potwierdzają również inne badania *in vivo* [33, 34]. Wesołowska i współpracownicy zademonstrowali aktywność przeciwdepresyjną związku SB-269970 po podaniu jednorazowym w testach u myszy i szczurów [35, 36]. Zasad-

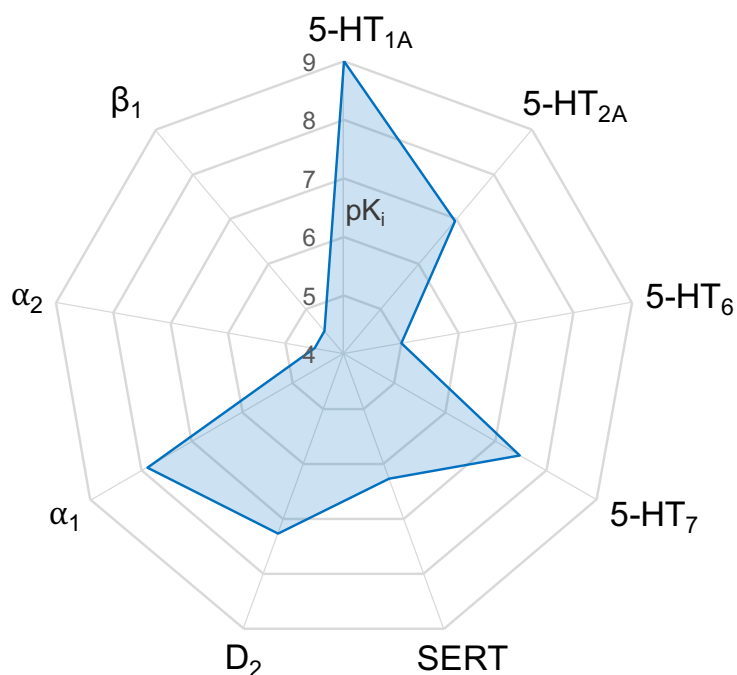


Rys. 1: Wzór chemiczny związku HBK-15.

ność prowadzenia badań nad zastosowaniem antagonistów receptora 5-HT₇ w terapii zaburzeń depresyjnych potwierdzają także eksperymenty na myszach transgenicznym. Badania zademonstrowały bowiem, że myszy genetycznie pozbawione receptora 5-HT₇, wykazywały istotnie krótszy czas bezruchu w teście wymuszonego pływania w porównaniu do grupy kontrolnej, czyli efekt podobny do podania leków przeciwdepresyjnych [37].

Zwiększenie szybkości pojawienia się odpowiedzi przeciwdepresyjnej może być również możliwe poprzez zablokowanie receptorów 5-HT₃ (szczegółowo omówione przez Gupta et al. [38]). Receptor 5-HT₃ różni się strukturalnie i funkcjonalnie od innych receptorów serotoninowych. Pobudzenie tego bramkowanego kanału jonowego, wywołuje szybką depolaryzację komórek w wyniku napływu jonów sodu i wapnia. Eksperymenty przedkliniczne sugerują, że blokada receptorów 5-HT₃ może leżeć u podstaw występowania szybszego efektu przeciwdepresyjnego po podaniu wortioksetyny [39]. Badacze jednoznacznie stwierdzili, że antagonizm względem receptora 5-HT₃ ma istotne znaczenie dla działania przeciwdepresyjnego tego leku [39, 40]. Podobne wyniki uzyskali Eisensamer i współpracownicy, którzy zademonstrowali, że różne klasy leków przeciwdepresyjnych działają jako funkcjonalni antagoniści ludzkiego receptora 5-HT₃ [41]. Co więcej, liczne badania *in vivo* potwierdzają aktywność potencjalnie przeciwdepresyjną antagonistów tego receptora [42–46].

Efektym poszukiwań nowych ligandów receptorów serotoninowych o potencjale przeciwdepresyjnym w grupie aroksyalkilowych pochodnych (2-metoksyfenylo)piperazyny, było wyselekcjonowanie związku HBK-15 (chlorowodurek 1-{2-[2-(2-(2-chloro-6-metylofenoksy)etoksy]etylo}-4-(2-metoksyfenylo)-piperazyny, Rys. 1) [47]. Badania radioreceptorowe wykazały, że związek ten posiada istotne powinowactwo do receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} oraz 5-HT₇, a



Rys. 2: Powinowactwo związku HBK-15 do receptorów serotoninowych, dopaminowych, adrenergicznych oraz transportera dla serotoniny (SERT).

także adrenergicznych α_1 i dopaminowych D_2 (Rys. 2) [47, 48]. Przeprowadzone w kolejnym etapie analizy funkcjonalne, wykonane w oparciu o pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia zademonstrowały, że HBK-15 jest antagonistą receptorów 5-HT_{1A} oraz 5-HT₇ [48]. W przesiewowych testach *in vivo* wykonanych na myszach i szczurach, związek po podaniu jednorazowym wykazał istotne działanie przeciwdepresyjne oraz przeciwłękowe [47, 48]. HBK-15 podany w dawkach przeciwdepresyjnych i przeciwłękowych nie wywoływał sedacji u zwierząt [47]. Dalsze prace nad związkiem wykazały, że mimo właściwości α_1 -adrenolitycznych HBK-15 podany jednorazowo w dawkach przeciwdepresyjnych, nie obniżał ciśnienia krwi u szczurów [49]. Warto podkreślić, że podanie związku nie wpływało również negatywnie na pracę serca szczurów [49]. Co ciekawe, HBK-15 zapobiegał wystąpieniu arytmii indukowanej przez adrenalinę [49], co może mieć znaczenie w przypadku zaburzeń rytmu serca na tle lękowym.

4.3.2. Cel pracy

Istnieje ogromna potrzeba znalezienia szybko działających leków przeciwdepresyjnych, które mogłyby być stosowane w terapii zaburzeń nastroju u różnych grup pacjentów. Biorąc zatem pod uwagę obiecujące wyniki wstępnych eksperymentów farmakologicznych nad HBK-15, celem badań których wynikiem jest osiągnięcie naukowe, będące przedmiotem przedłożonego wniosku, było:

- Potwierdzenie właściwości antagonistycznych związku HBK-15 wobec receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}, wykorzystując metodę badania aktywności wewnętrznej opartą o pomiar poziomu cAMP, a także oznaczenie aktywności wewnętrznej względem receptorów dopaminowych D₂ oraz serotoninowych 5-HT_{2A} w oparciu o pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia.
- Oznaczenie wpływu na receptory serotoninowe 5-HT₃, muskarynowe oraz histaminowe H₁ przy użyciu modelu izolowanego jelita świnki morskiej.
- Zbadanie aktywności przeciwdepresyjnej związku HBK-15 po podaniu przewlekłym, wykorzystując test wymuszonego pływania u myszy, a także ocena jego wpływu na poziom serotoniny w hipokampie.
- Oznaczenie wpływu badanego związku na funkcje poznawcze myszy w teście biernego unikania, a także ocenę zdolności odwracania deficytów pamięci powodowanych przez skopolaminę.
- Zbadanie aktywności przeciwdepresyjnej oraz przeciwlękowej związku HBK-15 w mysim modelu depresji indukowanej podaniem kortykosteronu, zarówno po podaniu jednokrotnym, jak i przewlekłym.

- Potwierdzenie aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwłękowej związku HBK-15 w modelu nieprzewidywalnego, chronicznego łagodnego stresu u myszy po podaniu przewlekłym.
- Oznaczenie wpływu wielokrotnej i pojedynczej iniekcji związku na poziom neurotrofin, BDNF oraz czynnika wzrostu nerwów (NGF), w hipokampie i korze przedczołowej w mysich modelach depresji.
- Ocena aktywności przeciwpsychotycznej HBK-15 w testach odwracania hiperlokomocji wywołanej podaniem amfetaminy i dizocylpiny oraz tendencji związku do wywoływania katalepsji u myszy.
- Zbadanie wpływu HBK-15 na próg drgawkowy w testach maksymalnego wstrząsu elektrycznego, drgawek wywołanych dożylnym podaniem pentylenetetrazolu i drgawek psychomotorycznych wywołanych prądem o częstotliwości 6 Hz u myszy oraz określenie powinowactwa do bramkowanych ligandem neuronalnych kanałów sodowych (miejsce 2).
- Wstępną ocenę bezpieczeństwa, oznaczając wpływ przewlekłego podania związku HBK-15 na ciśnienie tętnicze krwi, profil lipidowy, poziom glukozy oraz aktywność enzymów wątrobowych u szczurów, a także oznaczenie cytotoksyczności związku przy użyciu linii komórkowej ludzkiej hepatomy HepG2 i jego działania antyoksydacyjnego.
- Wstępną ocenę profilu farmakokinetycznego HBK-15.

4.3.3. Wyniki badań i dyskusja

H1. **Pytka K**, Gawlik K, Pawlica-Gosiewska D, Witalis J, Waszkielewicz A. HBK-14 and HBK-15 with antidepressant-like and/or memory-enhancing properties increase serotonin levels in the hippocampus after chronic treatment in mice. *Metabolic Brain Disease*. 2017, 32:547-556.

(Springer; IF₂₀₁₆ = 2,297; MNiSW₂₀₁₆ = 20 pkt)

Aktywność przeciwdepresyjna związku HBK-15 do tej pory oceniana była jedynie po podaniu jednorazowym [47, 48]. Często zdarza się, że po wielokrotnej iniekcji działanie przeciwdepresyjne zanika lub wręcz przeciwne, efekt pojawia się w dawce niższej, niż po podaniu jednorazowym [50, 51]. Mając to na uwadze, w niniejszej pracy zbadano aktywność przeciwdepresyjną związku HBK-15 po podaniu przewlekłym. Zarówno związek badany jak i referencyjny (fluoksetyna) podawane były myszom dootrzewnowo przez 21 dni. Dawki zostały dobrane na podstawie wcześniej przeprowadzonych eksperymentów [48]. 24 godziny po ostatniej iniekcji związku HBK-15 lub fluoksetyny, aktywność przeciwdepresyjna została oceniona przy użyciu testu wymuszonego pływania. Zaobserwowano, że podobnie do fluoksetyny, HBK-15 utrzymywał swoje działanie po wielokrotnej iniekcji. Co więcej, przy podaniu przewlekłym związek wykazywał aktywność w dawce dwukrotnie niższej (0,625 mg/kg), niż najniższa dawka przeciwdepresyjna po podaniu jednorazowym (1,25 mg/kg) [48]. HBK-15 nie wpływał na aktywność lokomotoryczną myszy, co potwierdziło specyficzność uzyskanych wyników. Warto podkreślić, że w teście wymuszonego pływania HBK-15 istotnie wydłużał czas pływania myszy, nie wpływając przy tym na czas wspinania. Leki przeciwdepresyjne, których działanie opiera się na interakcji z układem serotonergicznym istotnie wydłużają czas pływania gryzoni [52]. Wynik ten sugeruje zatem udział komponenty serotonergicznej w mechanizmie działania badanego związku.

Biorąc pod uwagę rezultaty powyższego eksperymentu, w kolejnym etapie zbadany został wpływ związku na poziom serotoniny w hipokampie. Hipokamp jest strukturą istotną z punktu widzenia zaburzeń nastroju i procesów poznawczych [14]. Serotonina z kolei pełni istotną rolę w regulacji jego funkcji (szczegółowo omówione przez Dale et al. [53]). Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy eksperymenty *ex vivo* z wykorzystaniem testów immunoenzymatycznych (ELISA)

wykazały, że wielokrotne (lecz nie pojedyncze) podanie HBK-15 w dawkach wywołujących efekt przeciwdepresyjny, istotnie podnosiło poziom serotoniny w hipokampie. Warto zauważyć, że wiele dostępnych leków przeciwdepresyjnych podnosi poziom serotoniny w tej strukturze mózgowej [53]. Uzyskane wyniki dodatkowo wspierają hipotezę, że HBK-15 może mieć potencjał przeciwdepresyjny.

Zaburzenia funkcji poznawczych bardzo często występują u pacjentów chorujących na depresję [11]. Z wyjątkiem wortioksetyny, która posiada umiarkowane działanie prokognitywne, większość obecnie stosowanych leków przeciwdepresyjnych nie wpływa lub wręcz upośledza funkcje poznawcze [16]. Niejednokrotnie upośledzenie funkcji poznawczych związane jest z właściwościami cholinolitycznymi leku (np. trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne). Biorąc to pod uwagę, w pierwszej kolejności oceniono wpływ związku HBK-15 na receptory muskarynowe. Eksperymenty przy użyciu modelu izolowanego jelita świnki morskiej, nie wykazały istotnej aktywności cholinolitycznej badanego związku ($pK_B = 6,01$).

W następnym etapie, aby wykluczyć negatywny wpływ związku HBK-15 na funkcje poznawcze, oceniono jego aktywność w teście biernego unikania u myszy. Test ten oparty jest na nabywaniu, przechowywaniu i utrzymaniu przez zwierzę awersyjnego warunkowania Pawłowskiego (bodziec bólowy). Reakcja biernego unikania angażuje procesy pamięci krótko- i długotrwałej oraz jest powiązana z uwagą, percepcją i integracją sensomotoryczną [54]. Zatem informacja czy związek upośledza ten złożony proces, jest niezwykle istotna w przypadku kandydatów na leki. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy eksperymenty zademonstrowały, że jednorazowe, dootrzewnowe podanie związku HBK-15 w dawce 0,625 mg/kg wydłużało o ok. 67% czas wejścia myszy do ciemnego pomieszczenia. Podanie pozostałych dawek (tj. 0,3 i 1,25 mg/kg) nie wpływało istotnie na funkcje poznawcze myszy. Wynik ten sugeruje, że HBK-15 posiada właściwości usprawniające procesy pamięciowe w wąskim zakresie dawek. Co więcej, podanie związku w dawce 0,625 mg/kg odwracało także zaburzenia pamięci powodowane przez skopolaminę (cholinolityk). Obserwowany efekt jest prawdopodobnie związany właściwościami antagonistycznymi związku HBK-15 względem receptorów 5-HT_{1A}. Udowodniono bowiem, że blokada receptorów 5-HT_{1A} może zwiększać uwalnianie acetylocholinylu i glutaminianu w hipokampie, co w konsekwencji prowadzi do poprawienia funkcji poznawczych [55].

Podsumowując, zaprezentowane w pracy **H1** badania wykazały, że **HBK-15** utrzymywał swoje działanie przeciwdepresyjne po podaniu przewlekłym, a efekt ten skorelowany był ze wzrostem poziomu serotoniny w hipokampie. Co istotne, **HBK-15** poprawiał także pamięć u myszy i nie posiadał istotnych właściwości cholinolitycznych.

H2. **Pytka K**, Głuch-Lutwin M, Kotańska M, Waszkielewicz A, Kij A, Walczak M. Single administration of HBK-15-a triple 5-HT_{1A}, 5-HT₇, and 5-HT₃ receptor antagonist-reverses depressive-like behaviors in mouse model of depression induced by corticosterone. *Molecular Neurobiology*. 2017 May 26. doi: 10.1007/s12035-017-0605-4.

(Springer; IF₂₀₁₆ = 6,190; MNiSW₂₀₁₆ = 40 pkt)

Aktywność związku HBK-15 była do tej pory oceniana w testach, lecz nie w modelach depresji. Należy zaznaczyć, że istnieje różnica między testem a modelem depresji. W testach behawioralnych manipulacje warunkami środowiskowymi zmieniają zachowanie zwierząt, które to z kolei modulowane jest przez leki przeciwdepresyjne. W odróżnieniu od testów, modele depresji próbują naśladować zmiany (nie tylko behawioralne, ale również neurochemiczne) obserwowane u osób chorujących na depresję, przez co efekty farmakologiczne można zaobserwować dla związków z rzeczywistym potencjałem przeciwdepresyjnym. Biorąc to pod uwagę, działanie przeciwdepresyjne związku HBK-15 ocenione zostało w modelu depresji indukowanej przewlekłym podaniem kortykosteronu. Model depresji indukowanej podaniem kortykosteronu jest szeroko stosowanym modelem w badaniach przedklinicznych [56]. Wykazano, że wielokrotne podanie tego glikokortykosteroidu powoduje zmiany w zachowaniu zwierząt (np. zmniejszenie spożycia roztworu sacharozy lub wydłużenie czasu bezruchu w teście wymuszonego pływania [57]), którym towarzyszą m.in. zaburzenia neurogenezy i zmniejszenie się wydzielania czynników neurotropowych [58, 59].

W pierwszym etapie badań opisanych w niniejszej pracy, zarówno kortykosteron jak i badany związek podawane były codziennie przez 3 tygodnie, a testy behawioralne wykonane po upływie przynajmniej 24 h od ostatniej iniekcji. Jako testy oceniające aktywność potencjalnie przeciwdepresyjną użyto testów wymuszonego pływania i preferencji sacharozy. Działanie przeciwłękowe oceniono wykorzystując test uniesionego labiryntu krzyżowego. Aktywność prze-

ciwdepresyjną oraz przeciwłękową zweryfikowano oznaczając wpływ związku na ruchliwość lokomotoryczną zwierząt. HBK-15 podawany był dootrzewnowo w dwóch dawkach (0,625 oraz 1,25 mg/kg), wybranych na podstawie wyników opisanych w pracy **H1**. Po zakończeniu wszystkich eksperymentów wyizolowano hipokampy, w których oznaczono poziom BDNF i NGF. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że myszy, którym podawany był HBK-15 w dawce 1,25 mg/kg (lecz nie 0,625 mg/kg), nie wykazywały zachowań depresyjnych (tj. zmniejszonej preferencji względem roztworu sacharozy czy wydłużonego czasu bezruchu w teście wymuszonego pływania). Ponadto badany związek zapobiegał obniżeniu poziomu BDNF oraz NGF w hipokampie, co jest jednym z efektów obserwowanych po podaniu leków przeciwdepresyjnych [60].

Biorąc pod uwagę wyniki eksperymentu przewlekłego, w kolejnym etapie oceniona została aktywność związku po podaniu jednokrotnym. Podobnie jak poprzednio, kortykosteron podawany był codziennie przez 3 tygodnie, natomiast HBK-15 jednorazowo 24 h po ostatniej iniekcji kortykosteronu. Do badania wybrano dawkę aktywną po podaniu przewlekłym tj. 1,25 mg/kg. Jako test oceniający aktywność przeciwdepresyjną użyto testu wymuszonego pływania, a wyniki zweryfikowano oceniając wpływ związku na ruchliwość lokomotoryczną myszy. Przeprowadzony eksperyment wykazał, że jednorazowe podanie HBK-15 skracało, wydłużony przez podanie kortykosteronu, czas bezruchu myszy do poziomu grupy kontrolnej. Co ciekawe, jednorazowe podanie HBK-15 regulowało także obniżony poziom BDNF (do poziomu oznaczonego u myszy kontrolnych, nie otrzymujących kortykosteronu). Podobne efekty powodowało podanie ketaminy, lecz nie fluoksetyny. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu są bardzo obiecujące, gdyż żaden z obecnie dostępnych leków przeciwdepresyjnych nie wykazuje aktywności po podaniu jednorazowym.

Kolejnym etapem badań było poszerzenie charakterystyki receptorowej związku HBK-15. W tym celu oznaczony został jego wpływ na receptory serotoniny 5-HT₃, wykorzystując model izolowanego jelita świnki morskiej. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów jednoznacznie wskazały, że HBK-15 jest silnym (porównywalnym do ondansetronu) niekompetycyjnym antagonistą tego receptora ($pK_B = 7,36$). Antagoniści receptorów 5-HT₃ wykazują istotne działanie przeciwdepresyjne u gryzoni [38]. Wydaje się zatem wysoce prawdopodobne, że blokowanie tych receptorów ma istotne znaczenie w mechanizmie działania związku HBK-15.

Ostatnim etapem badań prezentowanych w niniejszej pracy, była ocena profilu farmakokinetycznego związku HBK-15, podanego w dawce aktywnej w modelu depresji (1,25 mg/kg). Wyniki badań wykazały, że HBK-15 wchłaniał się szybko, przy czym najwyższe stężenie w mózgu osiągał po 5 min od podania dootrzewnowego, co jest efektem korzystnym. Związek charakteryzował się okresem półtrwania $t_{0,5} = 83,5$ min (podanie dootrzewnowe), dużą objętością dystrybucji oraz biodostępnością równą 54%. Zarówno po podaniu dootrzewnowym, jak i dożylnym związek HBK-15 dobrze przenikał przez barierę krew-mózg.

Podsumowując, zaprezentowane w pracy **H2** badania zademonstrowały, że **HBK-15 wykazywał działanie przeciwdepresyjne już po jednorazowym podaniu w modelu depresji indukowanej podaniem kortykosteronu u myszy**. W tym samym modelu aktywność przeciwdepresyjna oraz przeciwłękowa obserwowana była także po podaniu przewlekłym. Badania przy użyciu modelu izolowanego jelita świnki morskiej wykazały, że **HBK-15 jest silnym antagonistą receptorów 5-HT₃**. Badany związek w dawce 1,25 mg/kg wchłaniał się szybko, dobrze przenikał przez barierę krew-mózg oraz charakteryzował się stosunkowo wysoką biodostępnością.

H3. **Pytka K**, Głuch-Lutwin M, Kotańska M, Żmudzka E, Jakubczyk M, Waszkielewicz A, Janiszewska P, Walczak M. HBK-15 protects mice from stress-induced behavioral disturbances and changes in corticosterone, BDNF, and NGF levels. *Behavioural Brain Research*. 2017, 333:54-66.

(Elsevier; IF₂₀₁₆ = 3,002; MNiSW₂₀₁₆ = 30 pkt)

Aby potwierdzić potencjał przeciwdepresyjny związku HBK-15, w ramach kolejnej pracy oznaczona została jego aktywność przeciwdepresyjna w modelu nieprzewidywalnego chronicznego łagodnego stresu u myszy. Uważa się, że model ten jest jednym z najdoskonalszych modeli depresji tj. najlepiej obrazuje zmiany obserwowane u chorych na depresję [61]. Podobnie do modelu depresji indukowanej podaniem kortykosteronu, nieprzewidywalny, chroniczny łagodny stres powoduje negatywne zmiany w zachowaniu zwierząt oraz zaburzenia neurochemiczne [62].

Opisana w niniejszej pracy procedura nieprzewidywalnego, łagodnego chronicznego stresu trwała 4 tygodnie. HBK-15 podawany był myszom raz dziennie w dawkach 1,25 lub

2,5 mg/kg, które zostały wybrane na podstawie wyników otrzymanych w pracy **H2**. Jako testy oceniające aktywność przeciwdepresyjną użyte zostały testy wymuszonego pływania oraz spożycia sacharozy. Eksperymenty wykazały, że w przeciwieństwie do myszy stresowanych, które otrzymywały sól fizjologiczną, u myszy którym podano HBK-15 w dawce 2,5 mg/kg (lecz nie 1,25 mg/kg) nie zaobserwowano zmniejszonego spożycia roztworu sacharozy oraz wydłużonego czasu bezruchu. Podobne wyniki otrzymano dla związku odniesienia - fluoksetyny. Podanie HBK-15 chroniło także stresowane myszy przed obniżeniem poziomu neurotrofin BDNF oraz NGF zarówno w hipokampie, jak i w korze przedczołowej. Dodatkowo badany związek zapobiegał wzrostowi poziomu kortykosteronu we krwi oraz zwiększeniu względnej masy nadnerczy. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że HBK-15 chronił zwierzęta przed negatywnymi skutkami nieprzewidywalnego, chronicznego łagodnego stresu.

Jak wspomniano w punkcie 4.1.3, w poprzednich badaniach aktywności wewnętrznej stwierdzono właściwości antagonistyczne związku wobec receptora 5-HT_{1A} stosując metodę opartą o pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia [48]. Opisane w niniejszej pracy analizy funkcjonalne, wykonane w oparciu o pomiar poziomu cAMP, potwierdziły, że badany związek jest antagonistą tego receptora. Właściwości antagonistyczne związku HBK-15 względem receptora 5-HT_{1A} zostały zatem potwierdzone w dwóch niezależnych metodach oceniających poziom wtórnych przekaźników, które biorą udział w procesie transdukcji sygnału. Ponadto w pracy **H3** zademonstrowano, że HBK-15 posiada właściwości antagonistyczne względem receptorów dopaminowych D₂ (IC₅₀ = 68 nM) oraz bardzo słabe, pomijalne, w stosunku do receptorów 5-HT_{2A} (IC₅₀ = 4450 nM).

Antagoniści receptorów D₂ mogą wykazywać aktywność przeciwpsychotyczną, ale też powodować działania niepożądane, takie jak katalepsja. W związku z tym ocenie poddano potencjalne działanie przeciwpsychotyczne HBK-15, wykorzystując dwa powszechnie stosowane testy u myszy – test odwracania hiperlokomocji wywoływanej podaniem amfetaminy oraz dizocylpiny (niekompetycyjny antagonist receptorów NMDA). HBK-15 podany w szerokim zakresie dawek (1,25 - 20 mg/kg), nie wykazał aktywności w powyższych testach, co sugeruje brak aktywności przeciwpsychotycznej. Podobnie, nie zaobserwowano tendencji związku do wywoływania katalepsji. W związku z tym można przypuszczać, że badany związek nie będzie

wywoływał zaburzeń pozapiramidowych, takich jak dyskinezy.

Ostatnim etapem badań prezentowanych w niniejszej pracy była ocena profilu farmakokinetycznego badanego związku, podanego w dawce aktywnej w powyższym modelu depresji, tj. 2,5 mg/kg. Wyniki eksperymentów wykazały, że HBK-15 wchłaniał się szybko, przy czym najwyższe stężenie w mózgu osiągał po 15 min od podania dootrzewnowego. Związek charakteryzował się okresem półtrwania $t_{0,5} = 63,7$ min (podanie dootrzewnowe), dużą objętością dystrybucji i biodostępnością równą 25%. Zarówno po podaniu dootrzewnowym jak i dożylnym dobrze przenikał barierę przez krew-mózg.

Warto zwrócić uwagę na różnice w biodostępności pomiędzy dawką 1,25 mg/kg (54%), opisaną w pracy **H2**, a dawką 2,5 mg/kg (25%). Jest kilka możliwych przyczyn tego zjawiska. Związki o charakterze zasadowym, do których należy HBK-15, mogą ulegać zjawisku lizosomotropizmu [63]. Tkanki bogate w lizosomy (np. płuca, wątroba, nerki czy śledziona) tworzą wewnątrzkomórkowy subkompartament o charakterze kwaśnym, co stanowi pułapkę dla leków zasadowych i sprzyja ich kumulacji [64]. Związek HBK-15 może być także substratem dla P-glikoproteiny, która aktywnie usuwa ksenobiotyki z wnętrza komórek, zapobiegając ich kumulacji i utrudniając osiągnięcie miejsc docelowych. Kolejną możliwością jest zjawisko autoindukcji, w efekcie której przyspiesza się metabolizm związku. Zaobserwowane różnice w biodostępności mogą także wynikać z kinetyki wysycenia, która to z kolei może wskazywać na nieliniowość w procesie farmakokinetyki.

Podsumowując, zaprezentowane w pracy **H3** badania wykazały, że **HBK-15 chronił myszy przed negatywnym wpływem nieprzewidywalnego, łagodnego chronicznego stresu**. Eksperymenty potwierdziły, że **badany związek jest antagonistą receptorów 5-HT_{1A}**. Pomimo właściwości antagonistycznych względem receptorów D₂, związek nie wykazał działania potencjalnie przeciwpsychotycznego oraz nie powodował katalepsji. **HBK-15 w dawce 2,5 mg/kg szybko się wchłaniał i dobrze przenikał barierę krew-mózg**.

H4. **Pytka K**, Socała K, Rapacz A, Nieoczym D, Pieróg M, Gryboś A, Siwek A, Waszkielewicz A, Wlaź P. HBK-14 and HBK-15, triple 5-HT_{1A}, 5-HT₇ and 5-HT₃ antagonists with potent antidepressant- and anxiolytic-like properties, increase seizure threshold in various seizure tests in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2017, 79:378-385.

(Elsevier; IF₂₀₁₆ = 4,187; MNiSW₂₀₁₆ = 35 pkt)

Depresja jest najczęstszym zaburzeniem psychicznym rozpoznawanym u pacjentów z padaczką [19]. Niestety, większość leków przeciwdepresyjnych obniża próg drgawkowy [21]. Mając to na uwadze, przeprowadzone w niniejszej pracy eksperymenty miały na celu ocenę wpływu HBK-15 na próg drgawkowy u myszy. Do tego celu użyto trzech powszechnie stosowanych testów: testu maksymalnego wstrząsu elektrycznego, testu drgawek wywołanych dożylnym podaniem pentylenetetrazolu i testu drgawek psychomotorycznych wywoływanych prądem o częstotliwości 6 Hz. We wszystkich eksperymentach HBK-15 podawany był dootrzewnowo.

W pierwszej kolejności oznaczony został wpływ HBK-15 na próg drgawkowy w teście drgawek wywołanych podaniem pentylenetetrazolu. Pentylenetetrazol, niekompetycyjny antagonist receptoru GABA_A, wywołuje u zwierząt drgawki naśladujące mioklonie oraz uogólnione napady toniczno-kloniczne u ludzi [65]. HBK-15 nie wpływał na próg drgawkowy w tym teście, lecz znacząco zmniejszał śmiertelność myszy. Otrzymane wyniki sugerują, że badany związek nie wpływa istotnie na transmisję GABA-egiczną.

Kolejnym etapem była ocena aktywności związku w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego, który naśladuje uogólnione napady toniczno-kloniczne (*grand mal*) u ludzi [66]. Co ciekawe, HBK-15 istotnie podwyższał próg drgawkowy w tym teście. Ponieważ badany związek wykazał wysokie powinowactwo do bramkowanych napięciem neuronalnych kanałów sodowych (miejsce 2; IC₅₀ = 1.4 μM), jego działanie w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego mogło być związane z blokowaniem tych kanałów. Z drugiej strony, należy podkreślić, że związki, które silnie wiążą się z neuronalnymi kanałami sodowymi, mogą także wpływać na kanały sodowe obecne w mięśniu sercowym. To z kolei może prowadzić do zaburzeń rytmu serca. Warto zatem podkreślić, że w poprzednich badaniach nie zaobserwowano niepokojących zmian

w elektrokardiogramie po podaniu związku HBK-15 u szczurów [49].

Niektóre leki przeciwpadaczkowe (np. lewetiracetam) są nieaktywne w opisanych powyżej testach, ale wykazują działanie w teście drgawek psychomotorycznych wywoływanych prądem o częstotliwości 6 Hz [67]. W związku z tym kolejnym krokiem było oznaczenie potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej HBK-15 w teście drgawek psychomotorycznych wywoływanych prądem o częstotliwości 6 Hz. Drgawki psychomotoryczne wywoływane prądem o częstotliwości 6 Hz stanowią model napadów częściowych i potencjalny model padaczki lekoopornej [68]. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wykazały, że związek HBK-15 istotnie podwyższał próg drgawkowy w powyższym teście. Biorąc pod uwagę, że test drgawek psychomotorycznych wywoływanych prądem o częstotliwości 6 Hz uważany jest za model napadów lekoopornych, otrzymane wyniki są bardzo obiecujące.

Leki wpływające na ośrodkowy układ nerwowy mogą powodować utratę koordynacji oraz siły mięśniowej, stąd ostatnim etapem badań było określenie wpływu badanego związku na wytrzymałość mięśni szkieletowych i koordynację ruchową u myszy. Eksperymenty wykazały, że HBK-15 w dawkach stosowanych w testach drgawkowych, nie wykazał negatywnego wpływu na koordynację ruchową czy siłę mięśni gryzoni, co wskazuje na jego bezpieczeństwo.

Podsumowując, zaprezentowane w pracy **H4** badania wykazały, że w zależności od zastosowanego testu **HBK-15 podwyższał lub nie obniżał progu drgawkowego** u myszy. Ponadto **badany związek istotnie zmniejszał śmiertelność** zwierząt w teście drgawek indukowanych dożylną iniekcją pentylenetetrazolu. Powyższe właściwości mogą wynikać z **silnego powinowactwa badanego związku do bramkowanych napięciem neuronalnych kanałów sodowych (miejsce 2)**. HBK-15 nie upośledzał koordynacji ruchowej lub siły mięśniowej gryzoni, co wskazuje na jego bezpieczeństwo.

- H5. **Pytka K**, Głuch-Lutwin M, Knutelska J, Jakubczyk M, Waszkielewicz A, Kotańska M. HBK-14 and HBK-15 do not influence blood pressure, lipid profile, glucose level, or liver enzymes activity after chronic treatment in rats. *PLoS One*. 2016, 11:e0165495. (PLoS One; IF₂₀₁₆ = 2,806; MNiSW₂₀₁₆ = 35 pkt)

Ostatnim etapem badań nad związkiem HBK-15 była wstępna ocena jego bezpieczeństwa. W poprzednich eksperymentach HBK-15 wykazał istotne działanie antagonistyczne w stosunku do receptorów adrenergicznych α_1 , a także aktywność hipotensyjną po podaniu jednorazowym [49]. Mimo że działanie hipotensyjne występowało w dawkach wyższych niż przeciwdepresyjne, przewlekłe stosowanie HBK-15 mogłoby powodować obniżenie ciśnienia tętniczego. Biorąc to pod uwagę pierwszym etapem badań opisanych w niniejszej pracy była ocena wpływu HBK-15 na ciśnienie tętnicze krwi po podaniu przewlekłym. Związek podawany był szczurom dootrzewnowo przez dwa tygodnie w dawkach 1,25 i 2,5 mg/kg, a ciśnienie tętnicze mierzono 3 razy w tygodniu. Przeprowadzony eksperyment nie wykazał istotnego działania hipotensyjnego związku HBK-15 u gryzoni.

Leki przeciwdepresyjne mogą wpływać negatywnie na profil lipidowy [69–73] oraz gospodarkę węglowodanową [74], a także zaburzać funkcjonowanie wątroby [75]. W związku z tym kolejnym krokiem było oznaczenie wpływu przewlekłego podania związku HBK-15 na poziom triglicerydów, cholesterolu całkowitego, HDL, LDL, glukozy, aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginowej i γ -glutamylotransferazy we krwi. Analiza biochemiczna próbek krwi nie wykazała negatywnego wpływu HBK-15 na profil lipidowy, poziom glukozy czy aktywność enzymów wątrobowych. Podobnie, w eksperymentach oceniających potencjalną cytotoksyczność badanego związku przy użyciu linii komórkowej ludzkiej hepatomy HepG2, nie stwierdzono działania cytotoksycznego HBK-15 w stężeniu 1 μ M. Ponadto w przeprowadzonych testach oceniających wpływ osocza na zdolność redukcji żelaza, poziom tioli niebiałkowych oraz zdolność do neutralizacji wolnych rodników 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH), związek nie wykazał działania antyoksydacyjnego.

Blokada receptorów histaminowych H_1 w ośrodkowym układzie nerwowym może powodować różne niepożądane efekty, w tym zawroty głowy, lęki lub nasilony apetyt, prowadzący

do zwiększenia masy ciała. Biorąc to pod uwagę zbadany został wpływ związku HBK-15 na receptory H_1 przy użyciu modelu izolowanego jelita świnki morskiej. Badania wykazały, że HBK-15 posiadał bardzo słabe, pomijalne, właściwości przeciwhistaminowe ($pK_B = 6,19$).

Podsumowując, zaprezentowane w pracy **H5** badania wykazały, że **przewlekłe podanie HBK-15 nie wpływało istotnie na ciśnienie tętnicze krwi, profil lipidowy, poziom glukozy oraz nie zmieniało aktywności enzymów wątrobowych** u szczurów. **HBK-15 nie wykazał także istotnych właściwości przeciwhistaminowych** czy antyoksydacyjnych.

4.3.4. Podsumowanie

Na podstawie wyników badań, których rezultatem jest osiągnięcie naukowe, będące podstawą ubiegania o nadanie stopnia doktora habilitowanego, można wyciągnąć następujące wnioski:

- Przeprowadzone badania potwierdziły, że HBK-15 jest antagonistą receptora $5-HT_{1A}$. Ponadto związek silnie blokował receptory $5-HT_3$. HBK-15 wykazał także właściwości antagonistyczne względem receptora dopaminowego D_2 oraz posiadał wysokie powinowactwo do bramkowanych napięciem neuronalnych kanałów sodowych (miejsce 2). Związek nie wykazał znaczących właściwości cholinolitycznych czy przeciwhistaminowych.
- Badany związek utrzymywał aktywność przeciwdepresyjną po podaniu przewlekłym u myszy, która skorelowana była z podniesieniem poziomu serotoniny w hipokampie.
- HBK-15 wykazał działanie przeciwdepresyjne już po jednorazowym podaniu w mysim modelu depresji indukowanej podaniem kortykosteronu. W tym samym modelu wykazał aktywność przeciwdepresyjną i przeciwłękową po podaniu przewlekłym. Ponadto związek przeciwdziałał obniżeniu poziomu neurotrofin BDNF i NGF w hipokampie u myszy z wyindukowanym modelem depresji.
- HBK-15 wykazał aktywność przeciwdepresyjną oraz przeciwłękową po podaniu przewlekłym w modelu nieprzewidywalnego, przewlekłego łagodnego stresu u myszy. Podanie

związku zapobiegało obniżeniu poziomu BDNF i NGF w hipokampie oraz korze przedczołowej, a także przeciwdziało podniesieniu się poziomu kortykosteronu i względnej masy nadnerczy.

- HBK-15 wykazał dodatkowe właściwości prokognitywne, a także odwracał deficyty pamięci powodowane przez skopolaminę u myszy.
- Badany związek podany w szerokim zakresie dawek nie wykazał działania przeciwpsychotycznego oraz nie powodował katalepsji u myszy.
- HBK-15 nie wpływał lub nawet podwyższał próg drgawkowy w testach drgawkowych u myszy. Dodatkowo istotnie zmniejszał śmiertelność gryzoni w teście drgawek indukowanych dożylną iniekcją pentylenetetrazolu. Związek nie upośledzał koordynacji ruchowej czy siły mięśniowej myszy.
- Pomimo właściwości α_1 -adrenolitycznych, przewlekłe podanie HBK-15 nie wpływało istotnie na ciśnienie tętnicze krwi u szczurów. Badany związek nie zaburzał także profilu lipidowego, poziomu glukozy oraz nie zwiększał aktywności enzymów wątrobowych. Ponadto związek nie działał cytotoksycznie i nie wykazał aktywności antyoksydacyjnej.
- Z uwagi na szybkie wchłanianie związek HBK-15 może posłużyć jako struktura modelowa do dalszych modyfikacji, mających na celu poprawienie właściwości farmakokinetycznych.

Poszerzone badania farmakologiczne pozwoliły określić interesującą aktywność przeciwdepresyjną związku HBK-15 z dodatkową komponentą przeciwlękową i prokognitywną. Związek ten można traktować jako strukturę modelową w procesie poszukiwania nowych leków mogących znaleźć zastosowanie w terapii zaburzeń nastroju u różnych grup pacjentów.

4.3.5. Piśmiennictwo

- [1] World Health Organization — Depression. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>. Dostęp: 2017-11-11.
- [2] AL-HARBI. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Preference and Adherence* 6 (May 2012), 369–388.
- [3] HARMER, C. J., DUMAN, R. S., COWEN, P. J. How do antidepressants work? New perspectives for refining future treatment approaches. *The lancet. Psychiatry* 4, 5 (May 2017), 409–418.
- [4] BERMAN, R. M., CAPPIELLO, A., ANAND, A., OREN, D. A., HENINGER, G. R., CHARNEY, D. S., KRYSTAL, J. H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biological Psychiatry* 47, 4 (Feb. 2000), 351–354.
- [5] AUTRY, A. E., ADACHI, M., NOSYREVA, E., NA, E. S., LOS, M. F., CHENG, P.-F., KAVALLALI, E. T., MONTEGGIA, L. M. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature* 475, 7354 (June 2011), 91–95.
- [6] HIRSCHFELD, R. M. A. The comorbidity of major depression and anxiety disorders: recognition and management in primary care. *The Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry* 3, 6 (Dec. 2001), 244–254.
- [7] SARTORIUS, N., USTÜN, T. B., LECRUBIER, Y., WITTCHEN, H. U. Depression comorbid with anxiety: results from the WHO study on psychological disorders in primary health care. *The British Journal of Psychiatry. Supplement*, 30 (June 1996), 38–43.
- [8] PFEIFFER, P. N., GANOCZY, D., ILGEN, M., ZIVIN, K., VALENSTEIN, M. Comorbid anxiety as a suicide risk factor among depressed veterans. *Depression and Anxiety* 26, 8 (Aug. 2009), 752–757.
- [9] ARNOW, B. A., BLASEY, C., MANBER, R., CONSTANTINO, M. J., MARKOWITZ, J. C., KLEIN, D. N., THASE, M. E., KOCSIS, J. H., RUSH, A. J. Dropouts versus completers among chronically depressed outpatients. *Journal of Affective Disorders* 97, 1-3 (Jan. 2007), 197–202.
- [10] BALLENGER, J. C. Anxiety and depression: optimizing treatments. *The Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry* 2, 3 (June 2000), 71–79.
- [11] DAR CET, F., GARDIER, A. M., GAILLARD, R., DAVID, D. J., GUILLOUX, J.-P. Cognitive dysfunction in major depressive disorder. A translational review in animal models of the disease. *Pharmaceuticals* 9, 1 (Feb. 2016), 1–42.
- [12] TRIVEDI, M. H., GREER, T. L. Cognitive dysfunction in unipolar depression: implications for treatment. *Journal of Affective Disorders* 152-154 (Jan. 2014), 19–27.

- [13] ROCA, M., VIVES, M., LÓPEZ-NAVARRO, E., GARCÍA-CAMPAYO, J., GILI, M. Cognitive impairments and depression: a critical review. *Actas Españolas de Psiquiatría* 43, 5 (Sept. 2015), 187–193.
- [14] CAMPBELL, S., MACQUEEN, G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *Journal of Psychiatry & Neuroscience* 29, 6 (Nov. 2004), 417–426.
- [15] LEE, R. S. C., HERMENS, D. F., PORTER, M. A., REDOBLADO-HODGE, M. A. A meta-analysis of cognitive deficits in first-episode Major Depressive Disorder. *Journal of Affective Disorders* 140, 2 (Oct. 2012), 113–124.
- [16] ROSENBLAT, J. D., KAKAR, R., MCINTYRE, R. S. The Cognitive Effects of Antidepressants in Major Depressive Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 19, 2 (July 2015), 1–13.
- [17] MULIYALA, K. P., VARGHESE, M. The complex relationship between depression and dementia. *Annals of Indian Academy of Neurology* 13, Suppl 2 (Dec. 2010), S69–73.
- [18] PATTANAYAK, R. D., SAGAR, R. Depression in dementia patients: issues and challenges for a physician. *The Journal of the Association of Physicians of India* 59 (Oct. 2011), 650–652.
- [19] KWON, O.-Y., PARK, S.-P. Depression and anxiety in people with epilepsy. *Journal of Clinical Neurology* 10, 3 (July 2014), 175–188.
- [20] MAZZA, M., ORSUCCI, F., DE RISIO, S., BRIA, P., MAZZA, S. Epilepsy and depression: risk factors for suicide? *La Clinica Terapeutica* 155, 10 (Oct. 2004), 425–427.
- [21] MONTGOMERY, S. A. Antidepressants and seizures: emphasis on newer agents and clinical implications. *International Journal of Clinical Practice* 59, 12 (Dec. 2005), 1435–1440.
- [22] GHAREDAGHI, M. H., SEYEDABADI, M., GHIA, J.-E., DEHPOUR, A. R., RAHIMIAN, R. The role of different serotonin receptor subtypes in seizure susceptibility. *Experimental Brain Research* 232, 2 (Nov. 2013), 347–367.
- [23] PYTKA, K., MŁYNIEC, K., PODKOWA, K., PODKOWA, A., JAKUBCZYK, M., ŻMUDZKA, E., LUSTYK, K., SAPA, J., FILIPEK, B. The role of melatonin, neurokinin, neurotrophic tyrosine kinase and glucocorticoid receptors in antidepressant-like effect. *Pharmacological Reports* 69, 3 (Jan. 2017), 546–554.
- [24] PYTKA, K., PODKOWA, K., RAPACZ, A., PODKOWA, A., ŻMUDZKA, E., OLCZYK, A., SAPA, J., FILIPEK, B. The role of serotonergic, adrenergic and dopaminergic receptors in antidepressant-like effect. *Pharmacological Reports* 68, 2 (Apr. 2016), 263–274.
- [25] PYTKA, K., DZIUBINA, A., MŁYNIEC, K., DZIEDZICZAK, A., ŻMUDZKA, E., FURGAŁA, A., OLCZYK, A., SAPA, J., FILIPEK, B. The role of glutamatergic, GABA-ergic, and cholinergic

- receptors in depression and antidepressant-like effect. *Pharmacological Reports* 68, 2 (Apr. 2016), 443–450.
- [26] PALCHAUDHURI, M., FLÜGGE, G. 5-HT_{1A} receptor expression in pyramidal neurons of cortical and limbic brain regions. *Cell and Tissue Research* 321, 2 (Aug. 2005), 159–172.
- [27] SANTANA, N., BORTOLOZZI, A., SERRATS, J., MENGOD, G., ARTIGAS, F. Expression of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 14, 10 (Oct. 2004), 1100–1109.
- [28] STOCKMEIER, C. A., SHAPIRO, L. A., DILLEY, G. E., KOLLI, T. N., FRIEDMAN, L., RAJKOWSKA, G. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression—postmortem evidence for decreased serotonin activity. *The Journal of Neuroscience* 18, 18 (Sept. 1998), 7394–7401.
- [29] PARKS, C. L., ROBINSON, P. S., SIBILLE, E., SHENK, T., TOTH, M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 18 (Sept. 1998), 10734–10739.
- [30] HEISLER, L. K., CHU, H. M., BRENNAN, T. J., DANA, J. A., BAJWA, P., PARSONS, L. H., TECOTT, L. H. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 25 (Dec. 1998), 15049–15054.
- [31] RICHARDSON-JONES, J. W., CRAIG, C. P., GUIARD, B. P., STEPHEN, A., METZGER, K. L., KUNG, H. F., GARDIER, A. M., DRANOVSKY, A., DAVID, D. J., BECK, S. G., HEN, R., LEONARDO, E. D. 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 65, 1 (Jan. 2010), 40–52.
- [32] MNIE-FILALI, O., FAURE, C., LAMBAS-SENAS, L., EL MANSARI, M., BELBLIDIA, H., GONDARD, E., ETIÉVANT, A., SCARNA, H., DIDIER, A., BEROD, A., BLIER, P., HADDJERI, N. Pharmacological blockade of 5-HT₇ receptors as a putative fast acting antidepressant strategy. *Neuropsychopharmacology* 36, 6 (May 2011), 1275–1288.
- [33] BONAVENTURE, P., KELLY, L., ALUISIO, L., SHELTON, J., LORD, B., GALICI, R., MILLER, K., ATACK, J., LOVENBERG, T. W., DUGOVIC, C. Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321, 2 (May 2007), 690–698.
- [34] MNIE-FILALI, O., LAMBAS-SENAS, L., ZIMMER, L., HADDJERI, N. 5-HT₇ receptor antagonists as a new class of antidepressants. *Drug News & Perspectives* 20, 10 (Dec. 2007), 613–618.

- [35] WESOŁOWSKA, A., NIKIFORUK, A., STACHOWICZ, K., TATARCZYŃSKA, E. Effect of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology* 51, 3 (Sept. 2006), 578–586.
- [36] WESOŁOWSKA, A., NIKIFORUK, A., STACHOWICZ, K. Potential anxiolytic and antidepressant effects of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB 269970 after intrahippocampal administration to rats. *European Journal of Pharmacology* 553, 1-3 (Dec. 2006), 185–190.
- [37] GUSCOTT, M., BRISTOW, L. J., HADINGHAM, K., ROSAHL, T. W., BEER, M. S., STANTON, J. A., BROMIDGE, F., OWENS, A. P., HUSCROFT, I., MYERS, J., RUPNIAK, N. M., PATEL, S., WHITING, P. J., HUTSON, P. H., FONE, K. C., BIELLO, S. M., KULAGOWSKI, J. J., MCALLISTER, G. Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT7 receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology* 48, 4 (Mar. 2005), 492–502.
- [38] GUPTA, D., PRABHAKAR, V., RADHAKRISHNAN, M. 5HT3 receptors: Target for new antidepressant drugs. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 64 (May 2016), 311–325.
- [39] BÉTRY, C., PEHRSON, A. L., ETIÉVANT, A., EBERT, B., SANCHEZ, C., HADDJERI, N. The rapid recovery of 5-HT cell firing induced by the antidepressant vortioxetine involves 5-HT(3) receptor antagonism. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 16, 5 (June 2013), 1115–1127.
- [40] MØRK, A., PEHRSON, A., BRENNUM, L. T., NIELSEN, S. M., ZHONG, H., LASSEN, A. B., MILLER, S., WESTRICH, L., BOYLE, N. J., SÁNCHEZ, C., FISCHER, C. W., LIEBENBERG, N., WEGENER, G., BUNDGAARD, C., HOGG, S., BANG-ANDERSEN, B., STENSBØL, T. B. Pharmacological effects of Lu AA21004: a novel multimodal compound for the treatment of major depressive disorder. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 340, 3 (Mar. 2012), 666–675.
- [41] EISENSAMER, B., RAMMES, G., GIMPL, G., SHAPA, M., FERRARI, U., HAPFELMEIER, G., BONDY, B., PARSONS, C., GILLING, K., ZIEGLGÄNSBERGER, W., HOLSBOER, F., RUPPRECHT, R. Antidepressants are functional antagonists at the serotonin type 3 (5-HT3) receptor. *Molecular Psychiatry* 8, 12 (Nov. 2003), 994–1007.
- [42] GUPTA, D., RADHAKRISHNAN, M., KURHE, Y., THANGARAJ, D., PRABHAKAR, V., KANADE, P. Antidepressant-like effects of a novel 5-HT3 receptor antagonist 6z in acute and chronic murine models of depression. *Acta Pharmacologica Sinica* 35, 12 (Nov. 2014), 1493–1503.
- [43] GUPTA, D., RADHAKRISHNAN, M., THANGARAJ, D., KURHE, Y. Pharmacological evaluation of novel 5-HT3 receptor antagonist, QCM-13 (N-cyclohexyl-3-methoxyquinoxalin-2-carboxamide) as anti-anxiety agent in behavioral test battery. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 7, 2 (Apr. 2015), 103–108.

- [44] GUPTA, D., RADHAKRISHNAN, M., KURHE, Y. Effect of a novel 5-HT₃ receptor antagonist 4i, in corticosterone-induced depression-like behavior and oxidative stress in mice. *Steroids* 96, C (Apr. 2015), 95–102.
- [45] GUPTA, D., RADHAKRISHNAN, M., KURHE, Y. 5HT₃ receptor antagonist (ondansetron) reverses depressive behavior evoked by chronic unpredictable stress in mice: modulation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical and brain serotonergic system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 124 (Sept. 2014), 129–136.
- [46] GUPTA, D., RADHAKRISHNAN, M., THANGARAJ, D., KURHE, Y. Antidepressant and anti-anxiety like effects of 4i (N-(3-chloro-2-methylphenyl) quinoxalin-2-carboxamide), a novel 5-HT₃ receptor antagonist in acute and chronic neurobehavioral rodent models. *European Journal of Pharmacology* 735 (July 2014), 59–67.
- [47] WASZKIELEWICZ, A. M., PYTKA, K., RAPACZ, A., WELNA, E., JARZYNA, M., SATAŁA, G., BOJARSKI, A., SAPA, J., ŻMUDZKI, P., FILIPEK, B., MARONA, H. Synthesis and evaluation of antidepressant-like activity of some 4-substituted 1-(2-methoxyphenyl)piperazine derivatives. *Chemical Biology & Drug Design* 85, 3 (Mar. 2015), 326–335.
- [48] PYTKA, K., PARTYKA, A., JASTRZĘBSKA-WIĘSEK, M., SIWEK, A., GŁUCH-LUTWIN, M., MORDYL, B., KAZEK, G., RAPACZ, A., OLCZYK, A., GAŁUSZKA, A., BŁACHUTA, M., WASZKIELEWICZ, A., MARONA, H., SAPA, J., FILIPEK, B., WESOŁOWSKA, A. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of new dual 5-HT_{1A} and 5-HT₇ antagonists in animal models. *PLoS ONE* 10, 11 (Nov. 2015), e0142499.
- [49] PYTKA, K., LUSTYK, K., ŻMUDZKA, E., KOTAŃSKA, M., SIWEK, A., ZYGMUNT, M., DZIEDZICZAK, A., ŚNIECIKOWSKA, J., OLCZYK, A., GAŁUSZKA, A., ŚMIEJA, J., WASZKIELEWICZ, A. M., MARONA, H., FILIPEK, B., SAPA, J., MOGILSKI, S. Chemically homogenous compounds with antagonistic properties at all α 1-adrenoceptor Subtypes but not β 1-adrenoceptor attenuate adrenaline-induced arrhythmia in rats. *Frontiers in Pharmacology* 7 (Aug. 2016), 48.
- [50] CONTRERAS, C. M., RODRIGUEZ-LANDA, J. F., GUTIÉRREZ-GARCÍA, A. G., BERNAL-MORALES, B. The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swim test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurones in the rat. *Journal of Psychopharmacology* 15, 4 (Dec. 2001), 231–236.
- [51] LOZANO HERNÁNDEZ, R., RODRÍGUEZ-LANDA, J. F., HERNANDEZ FIGUEROA, J. D., MARGARITA, S., RAFAEL, R. F., CRUZ SANCHEZ, J. S. Antidepressant-like effects of two commercially available products of *Hypericum perforatum* in the forced swim test: A long-term study. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 2 (Jan. 2010), 131–137.
- [52] NAKATOMI, Y., YOKOYAMA, C., KINOSHITA, S., MASAKI, D., TSUCHIDA, H., ONOE, H., YOSHIMOTO, K., FUKUI, K. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effect of the green leaves odor in mice. *Neuroscience Letters* 436, 2 (May 2008), 167–170.

- [53] DALE, E., PEHRSON, A. L., JEYARAJAH, T., LI, Y., LEISER, S. C., SMAGIN, G., OLSEN, C. K., SANCHEZ, C. Effects of serotonin in the hippocampus: how SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. *CNS Spectrums* 21, 2 (Apr. 2016), 143–161.
- [54] ÖGREN, S. O., STIEDL, O. Passive Avoidance. In *Encyclopedia of Psychopharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg, Apr. 2014, pp. 1–10.
- [55] SCHECHTER, L. E., SMITH, D. L., ROSENZWEIG-LIPSON, S., SUKOFF, S. J., DAWSON, L. A., MARQUIS, K., JONES, D., PIESLA, M., ANDREE, T., NAWOSCHIK, S., HARDER, J. A., WOMACK, M. D., BUCCAFUSCO, J., TERRY, A. V., HOEBEL, B., RADA, P., KELLY, M., ABOU-GHARBIA, M., BARRETT, J. E., CHILDERS, W. Lecozotan (SRA-333): a selective serotonin 1A receptor antagonist that enhances the stimulated release of glutamate and acetylcholine in the hippocampus and possesses cognitive-enhancing properties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314, 3 (Sept. 2005), 1274–1289.
- [56] KRISHNAN, V., NESTLER, E. J. Animal models of depression: molecular perspectives. *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 7 (Jan. 2011), 121–147.
- [57] HELLSTEN, J., WENNSTRÖM, M., MOHAPEL, P., EKDAHL, C. T., BENGZON, J., TINGSTRÖM, A. Electroconvulsive seizures increase hippocampal neurogenesis after chronic corticosterone treatment. *The European Journal of Neuroscience* 16, 2 (July 2002), 283–290.
- [58] MORALES-MEDINA, J. C., SANCHEZ, F., FLORES, G., DUMONT, Y., QUIRION, R. Morphological reorganization after repeated corticosterone administration in the hippocampus, nucleus accumbens and amygdala in the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 38, 4 (Dec. 2009), 266–272.
- [59] ALFAREZ, D. N., DE SIMONI, A., VELZING, E. H., BRACEY, E., JOËLS, M., EDWARDS, F. A., KRUGERS, H. J. Corticosterone reduces dendritic complexity in developing hippocampal CA1 neurons. *Hippocampus* 19, 9 (Sept. 2009), 828–836.
- [60] KRISHNAN, V., NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455, 7215 (Oct. 2008), 894–902.
- [61] WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 134, 4 (Dec. 1997), 319–329.
- [62] WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52, 2 (July 2005), 90–110.
- [63] WALCZAK, M. Binding of new aminopropan-2-ol compounds to bovine serum albumin, α 1 acid glycoprotein and rat serum using equilibrium dialysis and LC/MS/MS. *Pharmacological Reports* 65, 5 (Sept. 2013), 1294–1303.
- [64] DANIEL, W. A., WÓJCIKOWSKI, J. Lysosomal trapping as an important mechanism involved in the cellular distribution of perazine and in pharmacokinetic interaction with antidepressants. *European Neuropsychopharmacology* 9, 6 (Dec. 1999), 483–491.

- [65] WHITE, H. S. Chemoconvulsants. In *Neuropharmacology Methods in Epilepsy Research*, S. L. Peterson and T. E. Albertson, Eds. CRC Press, Dec. 1998.
- [66] LÖSCHER, W., SCHMIDT, D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia* 52, 4 (Apr. 2011), 657–678.
- [67] KLITGAARD, H., MATAGNE, A., GOBERT, J., WÜLFERT, E. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *European Journal of Pharmacology* 353, 2-3 (July 1998), 191–206.
- [68] BARTON, M. E., KLEIN, B. D., WOLF, H. H., WHITE, H. S. Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy Research* 47, 3 (Dec. 2001), 217–227.
- [69] LARA, N., BAKER, G. B., ARCHER, S. L., LE MELLÉDO, J.-M. Increased cholesterol levels during paroxetine administration in healthy men. *The Journal of Clinical Psychiatry* 64, 12 (Dec. 2003), 1455–1459.
- [70] BILICI, M., EFE, H., KÖROĞLU, M. A., UYDU, H. A., BEKAROĞLU, M., DEĞER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *Journal of Affective Disorders* 64, 1 (Apr. 2001), 43–51.
- [71] POLLOCK, B. G., PEREL, J. M., PARADIS, C. F., FASICZKA, A. L., REYNOLDS, C. F. Metabolic and physiologic consequences of nortriptyline treatment in the elderly. *Psychopharmacology Bulletin* 30, 2 (Jan. 1994), 145–150.
- [72] BRADWEJN, J., AHOKAS, A., STEIN, D. J., SALINAS, E., EMILIEN, G., WHITAKER, T. Venlafaxine extended-release capsules in panic disorder: flexible-dose, double-blind, placebo-controlled study. *The British Journal of Psychiatry* 187, 4 (Oct. 2005), 352–359.
- [73] YERAGANI, V. K., POHL, R., BALON, R., RAMESH, C., GLITZ, D. Increased serum total cholesterol to HDL - cholesterol ratio after imipramine. *Psychiatry Research* 32, 2 (May 1990), 207–209.
- [74] HENNINGS, J. M., SCHAAF, L., FULDA, S. Glucose metabolism and antidepressant medication. *Current Pharmaceutical Design* 18, 36 (May 2012), 5900–5919.
- [75] VOICAN, C. S., CORRUBLE, E., NAVEAU, S., PERLEMUTER, G. Antidepressant-induced liver injury: a review for clinicians. *The American Journal of Psychiatry* 171, 4 (Apr. 2014), 404–415.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

W trakcie studiów farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM zainteresowałam się tematyką poszukiwania związków biologicznie aktywnych oraz określaniem ich mechanizmów działania. Na IV roku studiów zapisałam się do Koła Farmakologicznego działającego przy Katedrze Farmakodynamiki UJ CM, gdzie zapoznawałam się z metodyką badań na zwierzętach. Moje prace w ramach Koła Farmakologicznego zostały dwukrotnie wyróżnione na konferencjach polskich i międzynarodowych. W 2007 r. zdobyłam **wyróżnienie za komunikat naukowy na International Medical Student's Conference w Krakowie** za pracę pt.: „Ocena działania analgetycznego nowych α -aminopodstawionych γ -butyrolaktonów i produktów ich aminolizy w wybranych testach przeciwbólowych” oraz **drugie miejsce na II Ogólnopolskim Kongresie Młodych Farmaceutów w Poznaniu** za pracę pt.: „Ocena działania przeciwhistaminowego monoterpenowych pochodnych propranololu w modelu izolowanego jelita świnki morskiej”.

Moje zainteresowanie badaniami farmakologicznymi spowodowało, że w 2008 r. zdecydowałam się na **5-miesięczny wyjazd do laboratorium dr. Trevora Bushell'a oraz dr. Andrew Paul'a na University of Strathclyde** (Glasgow, Wielka Brytania) w ramach wymiany studenckiej Erasmus. W czasie mojego stażu uczyłam się technik immunohistochemicznych oraz Western blot, dzięki czemu poszerzyłam mój warsztat badawczy o metody *in vitro*. Po powrocie do Polski, w tym samym roku obroniłam pracę magisterską pod kierunkiem dr hab. Tadeusza Librowskiego, prof. UJ. Po odbyciu obowiązkowej praktyki zawodowej, w 2009 r. rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM. W tym samym roku ukazała się publikacja **P1**, będąca wynikiem moich prac w ramach Koła Farmakologicznego.

Badania farmakologiczne w ramach mojej pracy doktorskiej prowadziłam w Katedrze Farmakodynamiki UJ CM. Eksperymenty wykonywałam na dwóch grupach związków tj. pochodnych ksantenu oraz aroksyalkilowych pochodnych *N*-(2-metoksyfenylo)piperazyny, zsyntezowanych

w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM, kierowanym przez prof. dr. hab. Henryka Maronę. Moje badania miały na celu znalezienie związków o potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej, które będą wykazywać dodatkowo działanie przeciwłękowe. Przeprowadzone eksperymenty zaowocowały wyselekcjonowaniem najbardziej aktywnych struktur z obu grup. Wyniki moich badań zaprezentowałam w 2012 r. na **VI Kopernikańskim Seminarium Doktoranckim w Toruniu** oraz **I Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów i Młodych Naukowców**. Na obu konferencjach **moje badania zostały wyróżnione**.

W latach 2011-2013 **kierowałam projektem dla młodych naukowców** pt.: „Ocena działania ośrodkowego nowych piperazynowych pochodnych ksantonu” finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Ponadto w tym czasie pod opieką prof. dr hab. Barbary Filipek poszerzałam swoją wiedzę przygotowując publikacje przeglądowe (prace **P7 - P12**). Brałam także udział w eksperymentach prowadzonych w Katedrze Farmakodynamiki, co zaowocowało współautorstwem w kilku publikacjach oryginalnych (prace **P2 - P5**).

W 2013 r. **obroniłam z wyróżnieniem pracę doktorską** pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Filipek. W tym samym roku ukazała się publikacja **P6**, będąca wynikiem współpracy z dr Anną Rapacz z Katedry Farmakodynamiki UJ CM, w której zademonstrowana została aktywność przeciwartmiczna oraz hipotensyjna nowych pochodnych ksantonu, zsyntezowanych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM.

Podsumowanie dorobku naukowego przed otrzymaniem stopnia doktora:

Liczba publikacji: **12**

Łączny *impact factor*: **5,037**

Łączna liczba punktów MNiSW: **94**

5.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych prowadziłam badania farmakologiczne w Katedrze Farmakodynamiki UJ CM. Moja działalność naukowa koncentrowała się głównie wokół poszukiwania nowych substancji o aktywności ośrodkowej. Kontynuowałam eksperymenty na najbardziej aktywnych związkach wyselekcjonowanych w ramach pracy doktorskiej. W badaniach wykorzystywałam testy i modele zwierzęce, służące do oceny działania przeciwdepresyjnego, przeciwłękowego oraz wpływu na procesy pamięciowe. Badania farmakologiczne na grupie aroksyalkilowych pochodnych (2-metoksyfenylo)piperazyny wykonywałam w ramach dwóch grantów dla młodych naukowców, finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, pt.:

- „Wpływ nowych aroksyalkilowych pochodnych 2-metoksyfenylopiperazyny na ośrodkowy układ nerwowy i układ krążenia” (2014-2016)
- „Ocena potencjalnej aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwłękowej nowych aroksyalkilowych pochodnych 2-metoksyfenylopiperazyny w mysich modelach depresji” (2017-2019)

Badania przeprowadzone w ramach powyższych projektów oraz współpracy z Zakładem Farmacji Klinicznej UJ CM, kierowanym przez prof. dr hab. Annę Wesołowską, pozwoliły na wyselekcjonowanie związków o działaniu przeciwdepresyjnym oraz przeciwłękowym, w tym najaktywniejszej (2-aroksyetoksy)etylowej pochodnej 2-metoksyfenylopiperazyny - związku HBK-15 (prace **D3**, **D10** oraz **D11**). Ponadto dla tej grupy związków wykonałam badania na izolowanej aorticie i tętnicy ogonowej szczura oraz śledzionie myszy. Przeprowadzone eksperymenty wykazały wyraźne różnice pomiędzy związkami w blokowaniu poszczególnych podtypów receptora α_1 -adrenergicznego. To z kolei miało swoje odzwierciedlenie w aktywności przeciwartmicznej, tj. związki które silniej blokowały podtyp α_{1A} , wykazywały silniejsze działanie przeciwartmiczne (praca **D15**).

Poszerzone badania farmakologiczne nad związkiem HBK-15 stały się podstawą ubiegania o nadanie stopnia doktora habilitowanego. Wyniki eksperymentów zostały szczegółowo opisane

w punkcie 4.3 (prace habilitacyjne **H1** - **H5**). Wykonane przeze mnie badania na izolowanych tkankach zwierzęcych pozwoliły na poszerzenie charakterystyki związku HBK-15 o receptory 5-HT₃, M i H₁ (prace **H1**, **H2** i **H5**). Dzięki współpracy z Zakładem Radioligandów Katedry Farmakobiologii UJ CM, kierowanym przez dr. hab. Tadeusza Librowskiego, prof. UJ, oznaczono także aktywność wewnętrzną badanego związku względem receptorów 5-HT_{1A} (praca **H3**). Wyniki powyższych eksperymentów potwierdziły, że związek HBK-15 jest antagonistą receptorów 5-HT_{1A}, a także silnie blokuje receptory 5-HT₃. To skłoniło mnie do przygotowania publikacji przeglądowych **D24** - **D26**, w których omówiono m.in. udział poszczególnych podtypów receptorów serotoninowych w działaniu przeciwdepresyjnym. Ponadto, w wyniku współpracy z dr. hab. Katarzyną Młyniec, prof. UJ, brałam udział w przygotowaniu publikacji omawiających znaczenie poszczególnych pierwiastków w zaburzeniach nastroju (prace **D22** i **D23**).

W kolejnym etapie badań nad HBK-15, wykorzystując modele *in vivo* tj. model depresji indukowanej podaniem kortykosteronu oraz model nieprzewidywalnego, chronicznego łagodnego stresu, wykazałam istotną aktywność przeciwdepresyjną i przeciwlekową badanego związku (prace **H1** - **H3**). Właściwości poprawiające pamięć posiadane przez HBK-15, oznaczyłam w oparciu o test biernego unikania (praca **H1**). Z kolei wpływ związku na próg drgawkowy u myszy (praca **H4**) oceniłam we współpracy z Zakładem Fizjologii Zwierząt, Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, kierowanym przez prof. dr. hab. Piotra Wlazia. Ponadto dzięki współpracy z Katedrą Toksykologii UJ CM, kierowaną przez dr. hab. Marię Walczak, przeprowadzono badania oceniające profil farmakokinetyczny związku HBK-15 (prace **H2** i **H3**), a także wyselekcjonowanej struktury z grupy pochodnych ksantonu (praca **D5**).

Eksperymenty farmakologiczne przeprowadzone w drugiej grupie badanych związków, tj. pochodnych ksantonu, również pozwoliły na wyselekcjonowanie struktur o istotnym działaniu przeciwdepresyjnym, ale pozbawionych aktywności przeciwlekowej. Pomimo niskiego powinowactwa do receptorów serotoninowych czy transportera serotoniny, działanie najbardziej aktywnych struktur związane było z aktywacją układu serotoninowego. Wyniki poszerzonych badań nad pochodnymi ksantonu zostały opisane w pracach **D1**, **D4**, **D5**, **D12** oraz **D13**.

Kolejnym kierunkiem moich zainteresowań było poszukiwanie związków o właściwościach przeciwaritmicznych wśród antagonistów receptora α_1 -adrenergicznego. Eksperymenty prowadziłam wraz ze współpracownikami Katedry Farmakodynamiki UJ CM, (w tym z dr Anną Rapacz), w grupie pochodnych ksantonu, które zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej. Rezultatem naszych badań było wyselekcjonowanie kilku pochodnych ksantonu o właściwościach α_1 -adrenolitycznych. Związki wykazały istotną aktywność przeciwaritmiczną w różnych modelach arytmii (prace **D2**, **D6** - **D8**). Moja współpraca z dr Anną Rapacz pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Filipek zaowocowała również powstaniem kilku publikacji przeglądowych (prace **D27-29**), w których poruszane były aktualne tematy z dziedziny farmakologii i farmakoterapii.

W ramach projektów badawczych prowadzonych ze współpracownikami Katedry Farmakodynamiki UJ CM, w 2014 r. rozpoczęłam eksperymenty mające na celu znalezienie związków skutecznie i bezpiecznie zmniejszających masę ciała oraz korzystnie wpływających na metabolizm. Wraz z dr Magdaleną Kotańską poszukiwałyśmy nowych struktur o potencjale anorektycznym oraz nowych punktów uchwytu dla związków o działaniu zmniejszającym masę ciała. Efektem naszej współpracy są prace **D9**, **D16** oraz **D19**, w których zademonstrowane zostały związki aktywne w zwierzęcych modelach otyłości. Ponadto powstała także praca przeglądowa **D30** poruszająca problem otyłości wśród osób chorych na schizofrenię. Nawiązałam również współpracę z dr hab. Małgorzatą Zygmunt, w wyniku której powstała praca **D17**, demonstrująca aktywność przeciwdepresyjną i przeciwłękową ligandów receptorów adenozynowych A_{2A} , a także publikacja przeglądowa **D21**, omawiająca postępy w leczeniu choroby Parkinsona.

W latach 2012-2016 byłam wykonawcą części badań farmakologicznych w dwóch grantach OPUS, finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, otrzymanych przez współpracowników Katedry Farmakodynamiki UJ CM pt.:

- „Częściowi agoniści receptorów $\alpha_{1A/D}$ -adrenergicznych jako potencjalne związki poprawiające parametry urodynamiczne w łagodnym przeroście gruczołu krokowego” (DEC-2011/03/B/NZ7/00724), kierownik: dr hab. Jacek Sapa, prof. UJ,

- „Badanie aktywności farmakologicznej nowych, nieselektywnych inhibitorów transportu zwrotnego kwasu γ -aminomasłowego (GABA) w wybranych modelach behawioralnych z wykorzystaniem sztucznej inteligencji jako metody analizy i klasyfikacji zachowań oraz predykcji efektywnych i toksycznych przedziałów dawkowania” (DEC-2012/05/B/NZ7/02705), kierownik: dr hab. Kinga Sałat, prof. UJ.

W obu projektach moje zadanie badawcze obejmowało oznaczenia na izolowanych tkankach zwierzęcych.

W latach 2014-2017 byłam wykonawcą części badań farmakologicznych w projekcie OPUS pt.: „Poszukiwanie związków o działaniu ośrodkowym” (DEC-2013/11/B/NZ7/04834) finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki i kierowanym przez dr hab. Annę Waszkielewicz z Zakładu Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM. Rezultatem badań przeprowadzonych w ramach grantu była praca **D18**, w której opisano nowe związki o aktywności przeciwdrgawkowej oraz analgetycznej w grupie pochodnych aminoalkanoli. Ponadto w 2017 r. praca pt.: „Synthesis and *in vivo* evaluation of the activity of some xanthone derivatives on the central nervous system”, która powstała w ramach wyżej wspomnianego projektu, zdobyła **nagrodę za najlepszą prezentację na 19th International Conference on Medicinal Chemistry and Drug Design w Londynie** (Wielka Brytania). Kontynuując współpracę w Zakładem Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej, wykonałam poszerzone eksperymenty farmakologiczne dla amidoalkanolowych pochodnych kwasu cynamonowego. Przeprowadzone badania zaowocowały wyselekcjonowaniem związku o aktywności przeciwdepresyjnej oraz przeciwlękowej, który został opisany w pracy **D14**.

W 2016 r. rozpoczęłam badania nad nowymi selektywnymi funkcjonalnie agonistami receptora 5-HT_{1A} w ramach grantu OPUS pt.: „Poszukiwanie selektywnych funkcjonalnie agonistów receptora 5-HT_{1A} jako nowych narzędzi farmakologicznych w opracowaniu terapii schorzeń psychiatrycznych i neurodegeneracyjnych” (DEC-2015/19/B/NZ7/03543) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki i kierowanego przez dr. hab. Marcina Kołaczekowskiego, prof. UJ z Katedry Chemii Leków UJ CM. W ramach współpracy realizowany jest doktorat mgr Moniki Głuch-Lutwin, w którym jestem promotorem pomocniczym.

Ponadto w 2017 r. brałam udział w drugim projekcie kierowanym przez dr. hab. Marcina Kołaczkowskiego, prof. UJ i realizowanym przy współpracy z firmą Adamed Sp. z o.o. pt.: „Opracowanie nowych kandydatów na leki w terapii behawioralnych i psychologicznych symptomów demencji (BPSD)”. Współpraca badawcza z zespołem dr. hab. Marcina Kołaczkowskiego, prof. UJ zaowocowała powstaniem pracy **D20**, w której zademonstrowano nowy związek o działaniu multireceptorowym, wykazujący aktywność przeciwpsychotyczną, modulującą nastrój oraz poprawiającą pamięć.

Celem poszerzenia warsztatu badawczego o nowe metody *in vitro*, w 2017 r. **odbyłam miesięczny staż naukowy w Katedrze Farmakologii na Wydziale Farmakologii, Toksykologii i Farmacji, University of Veterinary Medicine w Hanowerze** (Niemcy). Pod opieką naukową prof. dr. med. Wolfganga Löschera i dr Birthe Gericke uczyłam się wykonywać eksperymenty z wykorzystaniem hodowli komórkowych, stosując metody immunohistochemiczne oraz Western blot. W tym samym roku **otrzymałam finansowanie projektu MINIATURA** (Narodowe Centrum Nauki) pt.: „Poszukiwanie mechanizmów wewnątrzkomórkowych, odpowiedzialnych za szybki potencjalnie przeciwdepresyjny efekt związku HBK-15, antagonisty receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT₇ i 5-HT₃” (DEC-2017/01/B/X/00818). Celem grantu jest wyjaśnienie mechanizmu wewnątrzkomórkowego działania związku HBK-15 w oparciu o metodę ELISA.

Jestem **promotorem pomocniczym w 3 przewodach doktorskich**. W latach 2014-2016 doktoranci, którymi się opiekuję, zdobyli łącznie **4 nagrody na konferencjach krajowych i międzynarodowych**. W latach 2014-2017 opiekowałam się 5 magistrantami, spośród których praca pt.: „Aktywność farmakologiczna związku HBK-10 po podaniu przewlekłym” zdobyła **drugie miejsce w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich** w 2015 roku. Od 2013 r. opiekuję się studentami Farmakologicznego Koła Naukowego działającego przy Katedrze Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, w ramach którego przygotowuję studentów do prowadzenia badań naukowych oraz wystąpień publicznych. Studenci pod moją opieką zdobyli łącznie **7 nagród na konferencjach krajowych i międzynarodowych**. Ponadto w latach 2013-2017 sprawowałam opiekę naukową nad **5 laureatami Grantów Studenckiego Towarzystwa Naukowego UJ CM**.

Moje osiągnięcia naukowe zostały **dwukrotnie wyróżnione nagrodą Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM** w roku 2016 oraz 2017. Ponadto w 2017 r. zostałam **laureatką programu Mobilność Plus** finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w ramach którego sfinansowany zostanie mój udział w badaniach naukowych prowadzonych na Uniwersytecie Strathclyde w Glasgow (Wielka Brytania). Podczas mojego rocznego wyjazdu będę wykonywać eksperymenty elektrofizjologiczne techniką patch-clamp, co znacząco poszerzy mój warsztat badawczy.

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

Liczba publikacji: **30**

Łączny *impact factor*: **67,354**

Łączna liczba punktów MNiSW: **711**

5.3. Podsumowanie całego dorobku naukowego

Łączna liczba publikacji: **47**, w tym:

- publikacje znajdujące się w bazie Journal Citation Reports: **37**
- pozostałe publikacje: **10**

Łączny *impact factor*: **90,873**

Łączna liczba punktów MNiSW: **965**

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: **210**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **9**

Liczba projektów badawczych: **9**, w tym:

- kierownik projektu: **4**
- wykonawca: **5**

Łączna ilość streszczeń ze zjazdów: **73**, w tym:

- międzynarodowych: **39**
- krajowych: **34**

