

## Streszczenie w języku polskim

### Modulacja farmakologiczna aktywności epileptycznych, badania na modelach zwierzęcych

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zaadaptowanie modelu zwierzęcego przy użyciu techniki patch-clamp do badania aktywności epileptycznej w korze przedczołowej, oraz jego zastosowanie do badania mechanizmów działania istniejących leków oraz oceny potencjału terapeutycznego nowych substancji. Szczególną uwagę poświęcono krótkotrwałym epizodom epileptycznym, nazywanym wyładowaniami międzynapadowymi (*Interictal Epileptiform Discharges*, IEDs), które obserwowano nie tylko w przypadku padaczki, ale także w innych zaburzeniach, takich jak zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, ADHD), choroba afektywna dwubiegunowa, czy zaburzenia ze spektrum autyzmu. Początkowo skupiono się na znanym leku przeciwpadaczkowym, kwasie walproinowym, a następnie na kapsaicynie, która może stanowić potencjalnie nową opcję terapeutyczną. Na koniec, wykorzystując model IEDs, zademonstrowano przeciwpadaczkowe właściwości guanfacyny, leku powszechnie stosowanego w leczeniu ADHD.

Kora przedczołowa to region mózgu zaangażowany w kilka funkcji poznawczych, koordynujący myśli i działania, aby były zgodne z wewnętrznymi celami. Wyładowania międzynapadowe w tym regionie opisano w kilku zaburzeniach psychiatrycznych, w tym w chorobie afektywnej dwubiegunowej. Pierwszy artykuł włączony do przedstawionej rozprawy doktorskiej to artykuł oryginalny pt. „Valproic acid potently inhibits interictal-like epileptiform activity in prefrontal cortex pyramidal neurons”, opublikowany w *Neuroscience Letters*. Kwas walproinowy to dobrze znany lek przeciwpadaczkowy, którego mechanizm działania obejmuje nasilenie transmisji GABA-ergicznej oraz blokowanie kanałów sodowych zależnych od napięcia. Oprócz padaczki, kwas walproinowy jest powszechnie stosowany w chorobie afektywnej dwubiegunowej, chociaż jego mechanizm działania w tym kontekście nie jest całkowicie jasny. W tym badaniu użyliśmy metody indukowania IEDs w neuronach kory przedczołowej szczurów. Roztwór, w którym zanurzono skrawki mózgu szczura, nie zawierał jonów magnezu i miał podwyższone stężenie jonów potasu. Te warunki pozwoliły nam indukować IEDs czyli depolaryzacje krótsze niż 2 sekundy z wyzwaniem potencjałów czynnościowych, stabilne przez kilkadziesiąt minut. Pokazaliśmy, że obserwowane depolaryzacje były zależne od receptora N-metylo-D-asparaginowego (NMDA), ponieważ znany inhibitor NMDA, AP-5, eliminował tę aktywność. Ponadto zademonstrowaliśmy, że terapeutyczne stężenia kwasu walproinowego eliminowały

zarówno krótkotrwałą aktywność epileptyczną w sposób zależny od stężenia leku, jak i spontaniczne pobudzające potencjały postsynaptyczne (*Excitatory Post-Synaptic Potentials*, EPSPs). Dodatkowo badaliśmy pobudliwość neuronów i stwierdziliśmy, że kwas walproinowy zmniejsza pobudliwość neuronów kory przedczołowej.

Drugie badanie wchodzące w skład przedstawionej rozprawy doktorskiej to artykuł oryginalny pt. „Capsaicin inhibits sodium currents and epileptiform activity in prefrontal cortex pyramidal neurons”, opublikowany w *Neurochemistry International*. W tym przypadku zbadaliśmy potencjał terapeutyczny kapsaicyny – związku z rodziny waniloidów, najbardziej znanego jako aktywny składnik papryczek chili, odpowiedzialny za odczucie ostrego smaku. Związek ten od kilku lat jest stosowany w medycynie ze względu na swoje właściwości przeciwbólowe. W tym kontekście, obwodowego układu nerwowego, uważa się, że działa poprzez kanały kationowe TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid*, TRPV1). Rozpoczęliśmy nasze badania od sprawdzenia wpływu kapsaicyny na pobudliwość neuronalną. Pokazaliśmy, że kapsaicyna znacząco hamowała częstotliwość potencjałów czynnościowych, a co więcej, amplitudy ostatnich potencjałów czynnościowych w serii były znacznie zmniejszone w obecności kapsaicyny. Sugerowało to modulację o typie zależnego od użycia blokowania kanałów sodowych. Aby dalej zbadać tę interakcję, przeprowadziliśmy badania prądów sodowych w konfiguracji *voltage-clamp* i pokazaliśmy, że kapsaicyna silnie hamowała prądy sodowe poprzez przesunięcie krzywej inaktywacji. Ponadto obserwowaliśmy, że związek ten silnie wzmacniał zależne od użycia blokowanie kanałów sodowych, potwierdzając nasze wcześniejsze obserwacje. Następnie przetestowaliśmy działanie kapsaicyny w trzech różnych modelach aktywności padaczkowej: IEDs, długich epizodach epileptycznych wywołanych za pomocą płynu bez magnezu i 4-aminopirydyny (4-AP), inhibitora kanałów potasowych, oraz epizodach epileptycznych o pośrednim czasie trwania wywołanych pikrotoksyną, antagonistą receptora GABA oraz płynem zewnątrzkomórkowym bez magnezu. Kapsaicyna całkowicie blokowała aktywność epileptyczną w pierwszych dwóch modelach, a w trzecim skracała czas trwania epizodów. Co ciekawe, wyładowania wywołane 4-AP były odporne na działanie kwasu walproinowego. Wszystkie powyższe odkrycia stanowią podstawę do rozważenia kapsaicyny jako strukturalnej ramy do opracowania nowych leków przeciwpadaczkowych.

Trzecia publikacja, wchodząca w skład przedstawionej rozprawy doktorskiej zatytułowana „Guanfacine inhibits interictal epileptiform events and sodium currents in prefrontal cortex

pyramidal neurons”, została opublikowana w *Pharmacological Reports*. Krótkotrwałe epizody epileptyczne występują u osób chorujących na ADHD i mogą przyczyniać się do objawów choroby. Jednocześnie kora przedczołowa jest centrum badań nad patofizjologią ADHD. W prezentowanym artykule postawiliśmy hipotezę, że znany lek na ADHD – guanfacyna – może działać przez inhibicję IEDs w korze przedczołowej. Korzystając z modelu przyjętego w poprzednich badaniach, pokazaliśmy, że guanfacyna skutecznie redukowałą IEDs czyli krótkotrwałą aktywność epileptyczną. Ponadto pokazaliśmy, że efekt był niezależny od receptora alfa-2-adrenergicznego, nominalnego miejsca działania guanfacyny, ponieważ w serii eksperymentów z idazoksanem – antagonistą receptora alfa-2-adrenergicznego efekt pozostał niezmienny. Wreszcie pokazaliśmy, że guanfacyna silnie hamowała prądy sodowe. Co ciekawe struktura chemiczna guanfacyny przypomina tę inhibitorów kanałów sodowych stosowanych w znieczuleniach miejscowych. Podsumowując, sugerujemy, że modulacja aktywności kanałów sodowych może być dodatkowym mechanizmem działania guanfacyny w ADHD, ponieważ przyczynia się do blokowania IEDs.

Ostatnia publikacja włączona do przedstawionej rozprawy doktorskiej to artykuł przeglądowy pt. „Beneficial Effects of Capsaicin in Disorders of the Central Nervous System”, opublikowany w *Molecules*. Artykuł ten podsumował dostępne dowody naukowe na temat korzystnych efektów kapsaicyny na szeroki zakres zaburzeń neurologicznych, w tym chorobę Parkinsona i Alzheimera, udar i migrenę. Największy nacisk położono na dane opisujące rolę kapsaicyny w badaniach nad padaczką. Co ciekawe, opisano zarówno działania proepileptyczne, jak i przeciwpadaczkowe kapsaicyny. Większość istniejących badań koncentruje się na formacji hipokampa i działaniach poprzez receptory TRPV1. W przedstawionym artykule proponujemy nowe ramy do zrozumienia tych pozornie sprzecznych wyników. Sugerujemy, że kapsaicyna wywiera swoje działanie proepileptyczne poprzez oddziaływanie na receptory TRPV1 w formacji hipokampa, natomiast jej działanie przeciwpadaczkowe wynika z hamowania kanałów sodowych w neuronach korowych. W nielicznych badaniach, w których podawano kapsaicynę w sposób ogólnoustrojowy, obserwowano dominację mechanizmu przeciwpadaczkowego.

Podsumowując, badania włączone do rozprawy doktorskiej zastosowały kilka modeli aktywności epileptycznej *in vitro*, aby, przy użyciu techniki patch-clamp, pogłębić nasze zrozumienie mechanizmów działania znanych leków (kwasu walproinowego, guanfacyny) i dostarczyć dowodów *in vitro* na potencjał terapeutyczny nowego środka – kapsaicyny. Ponadto,

przestudowano efekty kapsaicyny w szerszym kontekście zaburzeń neurologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem jej miejsca w terapii przeciwpadaczkowej. Uzyskane wyniki mogą wzbogacić nasze zrozumienie patofizjologii wielu zaburzeń, jak również dostarczyć nowych opcji terapeutycznych.

