

Załącznik nr 2a.

## **AUTOREFERAT**

### **I Dane personalne:**

Imię i nazwisko: Grzegorz Raszewski

Data i miejsce urodzenia: 11.03.1960r, Częstochowa

Zatrudnienie: Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki, Lublin

### **2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:**

- 1987r. - magister biologii,  
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin,
- 2002r. - doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej  
I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Akademia Medyczna w Lublinie  
Tytuł rozprawy: „Działanie obidoksyumu, atropiny i diazepamu na aktywność cholinoesteraz i przeżywalność zwierząt w ostrym zatruciu chlorfenwinfosem”,  
promotor: prof. dr hab. Maria Podolak-Majczak,  
recenzenci: prof. dr hab. Stefan Kossakowski, prof. dr hab. Wademar A. Turski

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

- 1990 – 1991: Zakład Toksykologii, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie, pracownik techniczno-naukowy.
- 1992 – 2003: Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie, asystent
- 2004 – 2005: Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie, adiunkt
- 2005 – Zakład Fizjopatologii, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie, adiunkt

**II. Wskazanie osiągnięcia naukowego 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. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

**A. tytuł osiągnięcia naukowego:**

**Cykl powiązanych tematycznie publikacji pod wspólnym tytułem:**

**„Aktywność neurotoksyczna wybranych związków endogennych i egzogennych - potencjalne znaczenie dla zaburzeń neurodegeneracyjnych”**

Do osiągnięcia naukowego zostało włączone 8 prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach, w tym 7 publikacji w czasopismach z Journal Citation Reports (JCR). Łączna punktacja cyklu publikacji: **IF = 11.536; KBN/MNiSW = 143 pkt.**

**B. wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:**

1. Latuszynska J, Luty S, **Raszewski G**, Przebirowska D, Tokarska-Rodak M.: Neurotoxic effect of dermally applied chlorpyrifos and cypermethrin. Reversibility of changes. Ann Agric Environ Med. 2003;10(2):197-201. **IF: 0.827; KBN/MNiSW: 8**

Mój wkład: istotny udział w planowaniu i przeprowadzeniu części eksperymentalnej badania, zebranie i analiza danych, udział w dyskusji oraz wstępne przygotowanie manuskryptu. Szacuję, mój wkład wynosi 40%.

2. **Raszewski G**, Lemieszek MK, Łukawski K, Juszcak M, Rzeski W. Chlorpyrifos and cypermethrin induce apoptosis in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2015;116(2):158-67. **IF: 3.097; KBN/MNiSW: 25**

Mój wkład: główny udział w planowaniu i przeprowadzeniu części eksperymentalnej badania, wykonanie pełnej analizy danych, które zostały przedstawione w publikacji, jak również przygotowania manuskryptu. Szacuję, mój wkład wynosi 70%.

3. **Raszewski G**, Lemieszek MK, Łukawski K. Cytotoxicity induced by cypermethrin in Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. Ann Agric Environ Med. 2016; 23(1):106-110. **IF: 0.895; KBN/MNiSW: 20**

Mój wkład: główny udział w planowaniu i przeprowadzeniu części eksperymentalnej badania, analiza danych, interpretacja i omówienie wyników, które są prezentowane w publikacji, jak również przygotowania manuskryptu. Szacuję, mój wkład wynosi 85%.

4. **Raszewski G.**, Filip R.: Correlation of therapeutic effect of obidoxime and dosing time in the acute intoxication by chlorfenvinphos in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009; 105(1): 37-45. **IF: 2.308; KBN/MNiSW: 20**

Mój wkład: główny udział w planowaniu i przeprowadzeniu części eksperymentalnej badania, wykonanie pełnej analizy danych, które zostały przedstawione w publikacji, jak również przygotowanie manuskryptu. Szacuję, mój wkład wynosi 85%.

5. **Raszewski G**, Lorocho M, Owoc A, Łukawski K, Filip R, Bojar I. Homocysteine and cognitive disorders of postmenopausal women measured by a battery of computer tests-central nervous system vital signs. *Arch Womens Ment Health*. 2015;18(4):623-30. **IF: 2.619; KBN/MNiSW: 30**

Mój wkład: główny udział w planowaniu i przeprowadzeniu części eksperymentalnej badania, wykonanie pełnej analizy danych, które zostały przedstawione w publikacji, jak również przygotowania manuskryptu. Szacuję, mój wkład wynosi 70%.

6. Bojar I, Owoc J, Wójcik-Fatła A, **Raszewski G**, Stanciak J, Raczkiewicz D.. Cognitive functions, lipid profile, and Apolipoprotein E gene polymorphism in postmenopausal women. *Ann Agric Environ Med*. 2015 11;22(2):313-19. **IF: 0.895; KBN/MNiSW: 20.**

Mój wkład: udział w planowaniu i przeprowadzeniu części eksperymentalnej badania, zebranie i analiza danych, udział w dyskusji na temat wyników badania. Szacuję, mój wkład wynosi 50%.

7. **Raszewski G**, Chwedorowicz R, Chwedorowicz A, Gustaw K. Homocysteine, antioxidant vitamins and lipids as biomarkers of neurodegeneration in Alzheimer's disease versus non-Alzheimer's dementia. *Ann Agric Environ Med*. 2016; 23: 193-96.. **IF: 0.895; KBN/MNiSW: 20**

Mój wkład: udział w planowaniu i przeprowadzeniu części eksperymentalnej badania, pełna analiza i interpretacja danych, przygotowanie manuskryptu. Szacuję mój udział na **70%**.

8. **Raszewski G.**, Gustaw K., Chwedorowicz R.: The endogenous antioxidants status in dementia patients with cognitive impairment and normal cognitive function. *Baltic Journal of Comparative & Clinical Systems Biology* 2011; 1: 13-23.

Mój wkład: udział w planowaniu i przeprowadzeniu części eksperymentalnej badania, pełna analiza i interpretacja danych, przygotowanie manuskryptu. Szacuję mój udział na **80%**.

### **C. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Przedstawiony cykl publikacji stanowi zbiór powiązanych tematycznie zagadnień dotyczących aktywności wybranych endogennych i egzogennych neurotoksyn i ich znaczeniu w procesach neurodegeneracyjnych.

#### **1. Wprowadzenie**

Obecnie uważa się, że istotną rolę w etiopatogenezie chorób neurodegeneracyjnych obok czynników genetycznych i tych związanych ze starzeniem się organizmu odgrywają różne egzo- i endogenne substancje oddziałujące na ośrodkowy układ nerwowy (OUN). Według ostatnich poglądów, postępująca degeneracja neuronów w chorobach neurodegeneracyjnych może być wynikiem długookresowego działania czynników środowiskowych, poprzez mechanizmy związane głównie ze stresem oksydacyjnym, dysfunkcją mitochondriów, ekscytotoksycznością, czynnikami neurotroficznymi, stanem neurozapalnym, zaburzeniami czynności proteasomów oraz apoptozą. Jest możliwe, że wszystkie te interakcje wzmacniają się wzajemnie, prowadząc do śmierci neuronów (Prentice i wsp. 2015; Wang i wsp. 2011).

Liczne dane epidemiologiczne wskazują na istnienie powiązań między występowaniem neurodegeneracyjnych chorób demencyjnych i ekspozycją na pestycydy (Zaganas i wsp. 2013), jednak mechanizm patogenezy tych efektów nie jest w pełni poznany. Szczególną neurotoksyczność dla ludzi wykazują insektycydy w tym związki organofosforanowe (ZOF) (Bjørling-Poulsen i wsp. 2008). Działanie neurotoksyczne wysokich dawek ZOF jest dość dobrze poznane i głównie objawia się znacznym hamowaniem enzymów z grupy cholinesteraz. W organizmach ssaków wyodrębniono acetylocholinoesterazę, AChE (EC 3.1.1.7) i butyrylocholinoesterazę BChE (EC 3.1.1.8), wykazujące odrębność reakcji substratowych, dystrybucji tkankowych, aktywności i powinowactwa do ZOF (Lotti 1995).

Poza dobrze znaną aktywnością katalityczną AChE i BChE w inaktywacji neuroprzebiegu cholinergicznego, pełnią one również istotną rolę w modulowaniu aktywności innych białek w tym w regulacji fosforylacji białka Tau i kaskady  $\beta$  amyloidu. Ponadto uczestniczą w modulowaniu regionalnego mózgowego przepływu krwi, co może mieć wpływ na tempo progresji AD (Lane i wsp 2006; Hachisu et al 2015).

Istnieją dowody na to, że AChE promuje tworzenie włókien  $\beta$  amyloidu w warunkach *in vivo*. Ponadto, stwierdzono, że powstałe kompleksy AChE i  $\beta$  amyloidu są bardziej toksyczny niż sam  $\beta$  amyloid (Reyes i wsp. 2004). W warunkach obecnego stanu wiedzy, uważa się, że jedną z przyczyn rozwoju AD może stanowić tzw. hipoteza cholinergiczna, wynikająca z zaburzonego funkcjonowania układu cholinergicznego (Terry i Buccafusco, 2003).

U podłoża patologii AD leży zwiększone nieznacznie (ok. 1,5 raza) wytwarzanie i gromadzenie w mózgu krótkiego peptydu  $\beta$  amyloidu i jego tendencja do agregacji i tworzenia złogów co prowadzi do utraty neuronów i demencji. Podstawowym wyzwaniem dla tej hipotezy jest znalezienie związku między  $\beta$  amyloidem, który jest związany z przyczyną AD i

białkiem Tau związanym z klinicznymi objawami tej choroby. Mechanizm związany z apoptozą komórek nerwowych w mózgu może być tym brakującym ogniwiem (Dickson, 2004). ZOF niezależne od zdolności blokowania esteraż, mogą również wpływać na układ nerwowy poprzez indukcję i modulowanie procesu programowanej śmierci komórki (PCD) – apoptozy, jako punktu docelowego ich neurotoksycznego działania w mózgu (Caughlan i wsp. 2004; Auman i wsp. 2000; Crumpton i wsp. 2000).

Czynnikiem o dużym potencjale neurotoksyczności jest homocysteina. Badania kilkunastu ostatnich lat wykazały, że homocysteina może być czynnikiem neurotoksycznym i odgrywać istotną rolę w chorobach zwyrodnieniowych układu nerwowego w różnych mechanizmach (Alexopoulos i wsp. 2010). Istnieje wiele dowodów na potwierdzenie jej neurotoksyczności i udziału w patogenezie chorób otępiennych (Ravaglia i wsp. 2005) oraz w procesach przyczyniających się do upośledzenia funkcji poznawczych (Permoda-Osip i wsp. 2014).

Innym ważnym zagadnieniem jest udział czynników neuroprotektoryjnych modulujących ryzyko wystąpienia chorób neurodegeneracyjnych. Do takich czynników należą np. estrogeny o udowodnionej roli w ochronnych działaniach na komórki ośrodkowego układu nerwowego i w przeciwdziałaniu rozwojowi degeneracji komórek nerwowych o różnej etiologii (Brann i wsp. 2007). Populacja kobiet pomenopauzalnych o obniżonym poziomie estrogenów jest szczególnie narażona na zwiększone ryzyko upośledzenia funkcji poznawczych w przypadku narażenia na neurotoksynę.

Na ocenę zmian poznawczych wpływają również czynniki genetyczne. Postuluje się wielogenową teorię powstawania zaburzeń poznawczych wraz z wiekiem. Obecność mutacji genów: białka prekursorowego amyloidu (APP), preseniliny 1 oraz preseniliny 2 wiąże się ze wzrostem wystąpienia choroby nawet w trzeciej dekadzie życia (postać autosomalna dominująca); natomiast polimorfizm genu apolipoproteiny E (APOE) wiąże się z podatnością na chorobę po 65 roku życia (Caselli, 2012). Z kolei wiadomo, że wysoki poziom homocysteiny oraz jednoczesne posiadanie genu ApoE4 upośledzają funkcje poznawcze w większym stopniu niż każdy z tych czynników osobno.

## 2. Przedstawienie wyników badań

- A. Ocena podostrej toksyczności mieszaniny organofosforowego związku chloropiryfosu i piretroidu  $\alpha$ -cypermetryny, dynamiki zmian aktywności cholinesteraz oraz zmian histopatologicznych wywołanych przez mieszaninę CPF+CM w mózgu szczura, *badania in vivo* [pub. 1].

Celem tej pracy była ocena podostrej neurotoksycznej aktywności mieszaniny chloropiryfosu (CPF) i  $\alpha$ -cypermetryny (CM) podawanej naskórnemu szczurom (4 godziny dziennie) w dawce  $27.8\text{mg}/\text{cm}^2$  (CPF) i  $2.7\text{mg}/\text{cm}^2$  CM (10:1), przez okres 1 i 4 tygodni, poprzez badanie jej wpływu na cholinesterazy w krwi i mózgu. Efekt był oceniany po 24godz. oraz po 1, 2 i 3 tygodniach ekspozycji. W pracy tej oceniano również histopatologiczne

zmiany w mózgu szczura wywoływane przez CPF i CM (CPF+CM) w toksyczności ostrej (1 tydzień) i podostrej (4 tygodnie) oraz czy zmiany te są odwracalne. Była to kontynuacja badań, których wyniki zostały opublikowane przed moim doktoratem [pub.9, zał.3].

Neurotoksyczność CPF w badaniach *in vivo* jak i *in vitro* jest dość dobrze udokumentowana (np. Richardson i wsp. 1995; Caughlan i wsp. 2004; Park i wsp. 2012). Również CM jest egzogenną trucizną o dużym powinowactwie do ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Neurotoksyczna aktywność pyretroidów w tym i CM była stwierdzana w badaniach, w których podnosi się możliwość zmian neurodegeneracyjnych w wyniku długotrwałej ekspozycji na te związki (Shafer i wsp. 2005 Sigh i wsp. 2012). Mimo, że neurotoksyczność obu pojedynczych preparatów była przedmiotem badań to w mieszaninie i w proporcjach w jakich te związki występują w preparatach handlowych (np. Nurelle D 550 EC) nie była dotąd przedmiotem badań.

Uzyskane wyniki wykazały, że (1) w 24 godz. po zatruciu CPF+CM aktywność butyrylocholinoesterazy (BChE) w surowicy zmniejsza się do 21% i 8% wartości kontrolnych, po 1 oraz po 4 tygodniach naskórnej ekspozycji, (2) po 1 tygodniu BChE uległa samoistnej reaktywacji do zbliżonego poziomu ok. 58% w obu warunkach ekspozycyjnych i (3) powróciła do wartości kontrolnych po 2 tygodniach od zakończenia eksperyment w obu grupach.

Dynamika zmian w aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) w mózgu i BChE w osoczu po ekspozycji na CPF + CM wykazywała istotne różnice.

Po 24 h od zatrucia, (1) aktywność AChE była znacznie większa (53 i 19%, aktywności kontrolnej, po 1 i 4 tygodniowej ekspozycji na CPF + CM; (2) po 1 tygodniu od zatrucia aktywność AChE samoistnie reaktywowała się do poziomu 72% i 61%, odpowiednio i (3) powróciła do wartości kontrolnych po 3 tygodniach.

Wyniki te wskazują, że w naskórnej ekspozycji na CPF + CM, zmiany w aktywności BChE nie w pełni odzwierciedlają zmiany w aktywności AChE w układzie nerwowym, co może mieć istotne znaczenie w monitorowaniu skutków zatrucia.

Badania histologiczne wykazały, że trzy tygodnie po ekspozycji na CPF+CM doszło do morfologicznych zmian w mózgach szczurów. Zmiany te koncentrowały się głównie w korze mózgowej, warstwie CA1 hipokampa, neurocytach jądra wzgórza, komórkach Purkiniego i w mózdzku.

**B. Ocena neurotoksyczności CPF w ludzkich dopaminergicznych komórkach Neuroblastoma SH-SY5Y, wpływ CM na neurotoksyczną aktywność CPF oraz badanie mechanizmów neurotoksyczności mieszaniny CPF i CM, badania *in vitro* [pub. 2].**

We wcześniejszych badaniach [1] stwierdziliśmy, że naskórne narażenie na mieszaninę CPF i CM skutkuje licznymi histopatologicznymi zmianami w mózgu szczura, jednak potencjalne mechanizmy stojące za neurotoksycznością tych związków nie były dotąd badane. Ten projekt miał na celu ocenę neurotoksyczności CPF i mieszaniny CPF z CM (w proporcji 10:1 tj. w jakiej występują w preparatach handlowych) zbadanie wpływu CM na neurotoksyczną aktywność CPF oraz zbadanie możliwych, molekularnych mechanizmów

stających za neurotoksycznością tych związków, w odniesieniu do ludzkich dopaminergicznych komórek Neuroblastoma SH-SY5Y.

Komórki linii Neuroblastoma SH-SY5Y wykazują szereg cech neuronów dopaminergicznych i w związku z tym jest powszechnie używana jako model komórkowy w badaniach dopaminergicznej patogenezy (Tsokos i wsp. 1987; Hasegawa i wsp. 2003).

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdziliśmy dawko- i czaso- zależną redukcję żywotności komórek SH-SY5Y po ekspozycji na CPF, mierzoną testem MTT. Sama CM w dawce 0 - 25  $\mu\text{M}$  nie wywierała toksycznego działania. Wpływ CM, stosowanej każdorazowo w dawce 1/10 dawki CPF, skutkowało, począwszy od stężenia 25  $\mu\text{M}$  do 500 $\mu\text{M}$  CPF, zwiększeniem toksyczności tak powstałej mieszaniny, po 24, 48 i 72 godz. ekspozycji. Oznaczona wartość  $\text{IC}_{50}$  po 24, 48 i 72 godz. dla CPF i CPF+CM wynosiła odpowiednio 313, 182, 51 $\mu\text{M}$  oraz 103, 66, 44  $\mu\text{M}$ .

W celu potwierdzenia wpływu tych substancji na indukcję apoptozy w komórkach SH-SY5Y badano mono- i oligonukleosomy (markery fragmentacji DNA i apoptycznej śmierci komórki), po 24 godz. ekspozycji.

Wyniki naszych badań pokazały, że 24 godz. ekspozycja badanych komórek na CPF i CPF+CM skutkowało dawko-zależną apoptozą, znaczące zmiany odnotowano po stosowaniu 25  $\mu\text{M}$  CPF i jego mieszaniny z 2,5  $\mu\text{M}$  CM. Ponadto komórki SH-SY5Y były bardziej wrażliwe na CPF+CM niż na sam CPF. Badanie to wykazało również, że CM, w stężeniach 1,75, 2,5 i 3  $\mu\text{M}$ , nie indukuje apoptozy w komórkach SH-SY5Y.

W celu zbadania mechanizmów, dzięki którym CPF i CPF + CM wywołuje apoptozę w komórkach SH-SY5Y, badaliśmy wpływ badanych związków na ekspresję białek zaangażowanych w śmierć komórek. Aktywacja kaspaz była widoczna w 1 do 3 godzinie stosowania CPF CPF + CM i czasy te były skorelowane z ekspresją białek antyapoptotycznych: Bcl-XL i Bcl-2. Badanie to wykazało również, że Q-VD-OPH, który hamuje aktywność całego spektrum kaspaz nie prowadzi do całkowitego zahamowania apoptozy komórek przez badane związki, co sugeruje, że zaangażowane są również inne mechanizmy.

Ponadto stosując specyficzne inhibitory PD98059 (ERK inhibitor), U0126 (MEK inhibitor), SB202190 (p38 $\alpha$  i p38 $\beta$  MAPK inhibitor) oraz SP600125 (JNK inhibitor) nie stwierdziliśmy zaangażowania układu MAP kinaz (mitogen-activated protein kinases) w inicjowaniu apoptozy.

Apoptoza jest indukowana przez tzw. receptory śmierci TNF (tumour necrosis factor) obejmujące CD95 (Fas / APO-1), DR3, TNF-R1 oraz dwa receptory TRAIL. Do dalszej analizy, zbadano ekspresję receptora CD95 i TNFR1/2 stosując specyficzne przeciwciała i farmakologiczny inhibitor wytwarzania TNF- $\alpha$  – pomalidomid (PLM). Otrzymane wyniki wyraźnie wskazały, że sygnalizacja związana z receptorami śmierci FAS/TNF może uczestniczyć w realizacji neurotoksyczności.

Podsumowując wykazano, że zarówno CPF i jego mieszanina z CM wywołuje neurotoksyczność w dopaminergicznych komórkach SH-SY5Y poprzez proces apoptozy. Mieszanina CPF+CM jest bardziej toksyczna dla komórek SH-SY5Y niż CPF stosowany samodzielnie. CM w niskich stężeniach nie powoduje apoptozy. Słaba odpowiedź komórek

SH-SY5Y na preinkubację z Q VD-Oph w hamowaniu apoptozy indukowanej przez CPF+CM może wskazywać, że nekroptoza lub autofagia może modyfikować neurotoksyczność pestycydów w tych komórkach (Park i wsp. 2013).

**C. Ocena neurotoksyczności CM w ludzkich dopaminergicznych komórkach Neuroblastoma SH-SY5Y i mechanizmów jej realizacji, badania *in vitro* [pub. 3]**

Nasze wcześniejsze badania [2], wykazały, że mieszanina CPF+CM jest bardziej toksyczna dla komórek SH-SY5Y niż CPF stosowane samodzielnie, oraz, że CM w niskich stężeniach, nie indukuje procesu apoptozy. Dlatego zdecydowaliśmy się zbadać neurotoksyczność CM, stosowanej w wyższych stężeniach, w warunkach eksperymentalnych podobnych do tych z poprzedniej pracy. Wiadome jest, że proces nekrozy może również służyć jako alternatywny zaprogramowany tryb śmierci komórki, wywołany przez te same sygnały, które indukują proces apoptozy. Zarówno nekroptoza jak i apoptoza są dobrze kontrolowanymi procesami biologicznymi, które odgrywają istotną rolę w procesach rozwojowych, homeostazie tkanek jak również w chorobach neurodegeneracyjnych (Prentice i wsp. 2015). Ponieważ, jak wykazaliśmy, możliwa droga realizacji cytotoksyczności CPF i jego mieszaniny z CM może być związana z nekroptozą, regulowanym procesem nekrozy, w tej pracy jako miernik cytotoksyczności wybraliśmy metodę pomiaru aktywności LDH jako miary śmierci komórek przez lizę.

Ekspozycja komórek SH-SY5Y na CM w stężeniach w zakresie 1-200 $\mu$ M po 24, 48 i 72 godz, powodowała zależną od dawki i czasu stosowania cytotoksyczność w dopaminergicznych komórkach SH-SY5Y. Kolejne eksperymenty przeprowadzono stosując CM w stężeniu 50  $\mu$ M, które powodowało po 48 godz. od zatrucia 45,9  $\pm$  3,26% cytotoksyczność w stosunku do komórek SH-SY5Y.

Pobudzenie receptorów śmierci, należących do nadrodziny receptorów TNF, które typowo wywołuje apoptozę również może indukować nekroptozę w różnych typach komórek (Nikoletopoulou i wsp. 2013). Dlatego zdecydowaliśmy się ustalić, czy aktywacja receptorów TNF pośredniczy w cytotoksyczności wywoływanej przez CM. Wykazano, że PLD farmakologiczne inhibitory produkcji TNF- $\alpha$ , zmniejszał cytotoksyczność indukowaną przez CM, co może świadczyć o zaangażowaniu receptorów TNF- $\alpha$  w indukcji nekroptozy w komórkach SH-SY5Y.

Ponadto, stwierdzono, że preinkubacja z Q-VD-Oph, inhibitorem kaspaz, skutkowało wzrostem cytotoksyczności CM względem linii komórkowej SH-SY5Y. Wyniki te są zgodne z innymi badaniami, że inhibitor kaspaz może przekierować komórki w kierunku procesu nekroptozy, zapobiegając jednocześnie procesowi autofagii, który jest odpowiedzialny za regulację homeostazy i umożliwia przeżycie komórek w warunkach stresowych. (Nikoletopoulou i wsp. 2013).

Również, stosując specyficzne inhibitory PD98059 (inhibitor ERK), U0126 (inhibitor MEK), SB202190 (p38a i p38 MAPK inhibitory) oraz SP600125 (inhibitor JNK), nie stwierdzono udziału MAP kinaz w indukcji nekroptozy wywołanej przez CM.

Podsumowując, wyniki badań wykazały, że jednym ze sposobów realizacji toksyczności przez CM w stosunku do ludzkich dopaminergicznych komórek Neuroblastoma SH-SY5Y może być regulowany proces nekrozy czyli nekroptoza.

Kolejna publikacja [4] ma związek z biochemicznymi procesami związanymi z podstawowym mechanizmem neurotoksycznego działania związków organofosforanowych (ZOF) czyli inaktywacją cholinoesteraz, szczególnie mózgowej acetylocholinoesterazy (AChE) i jej reaktywacją przez związki oksymowe.

**D.** Ocena ostrej aktywności neurotoksycznej związku organofosforanowego (ZOF) chlorfenwinfosu oraz badanie aktywności obidoksymu podawanego osobno oraz w mieszaninie z atropiną i diazepamem w reaktywowaniu zahamowanych esteraz w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i obwodowym układzie nerwowym (ObUN), *badania in vivo* [4].

Celem tego badania było określenie ostrej toksyczności chlorfenwinfosu (CVP) w OUN (mózg, rdzeń przedłużony) i ObUN (przepona, mięśnie międzyżebrowe) u szczurów oraz wpływ atropiny, obidoksymu i diazepamu na reaktywację zahamowanych przez CVP cholinoesteraz.

W skrócie, organofosforanowe inhibitory cholinesteraz, w tym CVP, blokuje funkcję AChE, co powoduje gromadzenie nadmiernych ilości acetylocholino w szczelinach synaptycznych, nadstymulację receptorów nikotynowych i muskarynowych i zaburzenia neurotransmisji. ZOF hamują AChE, tworząc z nią wiązanie kowalencyjne z miejscem aktywnym AChE (Lotti, 1995). Ufosforylowana AChE samoistnie jest reaktywowana bardzo wolno, ale proces ten może być przyspieszony przez m. in. związki oksymowi np. obidoksym (OBD), (Clement, 1992). Jednak OBD jest nieskuteczny w reaktywacji ufosforylowanej AChE w przypadku gdy kompleks enzym-inhibitor uległ tzw. reakcji „starzenia”, wtedy ufosforyzowana AChE nie podlega już reaktywującym właściwości oksymu, jest nieodwracalnie zahamowana i by przywrócić zdolność katalityczną potrzeba syntezy nowych cząstek enzymu (Eyer, 2003).

Badanie to wykazało, że ostre narażenie na CVP powodowało silne zmniejszenie aktywności AChE w mózgu, rdzeniu przedłużonym (OUN) oraz w przeponie i mięśniach międzyżebrowych (ObUN) w zakresie od 2,6% do 6,3% aktywności kontrolnej.

Podanie OBD, bezpośrednio i w 24 godz. po CVP, skutkowało znaczną reaktywacją zahamowanej AChE, szczególnie w ObUN. Jednak OBD podany w monoterapii lub w połączeniu z atropiną (ATR) i diazepamem (DZP) 48 godziny po CVP był już nieskuteczny w reaktywacji zahamowania enzymu w OUN, powodując niekorzystne efekty uboczne u szczurów.

Ponadto, wykazano, że zastosowanie OBD w kombinacji z ATR i OBD miało silne działanie synergistyczne ale tylko w pierwszej dobie zatrucia. Ponadto DZP zwiększało

skuteczność OBD i ATP w reaktywacji zahamowanej CVP esterazy, ale DZP podawany tylko z OBD nie był już skuteczny a nawet wykazywał działania niekorzystne.

Stwierdziliśmy, że efekt OBD po zatruciu CVP był silniejszy w ObUN niż w OUN. Wynikać to może z lepszej dostępności stosowanego oksymu do docelowych enzymów w synapsach nerwowo-mięśniowych i jak wykazały niniejsze badania ze znacznie szybszej samoistnej reaktywacji AChE w tych strukturach nerwowych oraz z utrudnionego i niepełnego dostępu OBD bezpośrednio do AChE w OUN (bariera krew-mózg).

- E. Ocena neurotoksyczności podwyższonych poziomów homocysteiny i profilu lipidowego oraz polimorfizmu genu apolipoproteiny E w aspekcie ich wpływu na zdolności poznawcze mierzone baterią testów CNS-VS, *badania w populacji kobiet po menopauzie* [pub. 5, 6].

Kolejne prace [5 i 6] koncentrowały się na endogennych czynnikach ryzyka rozwoju chorób neurodegeneracyjnych poprzez badanie ich wpływu na rozwój zaburzeń poznawczych. Populację badaną stanowiła grupa kobiet po menopauzie (170 osób), o podwyższonym ryzyku wystąpienia tych zaburzeń z uwagi na obniżony naturalnie poziom estradiolu. Jak powszechnie się przyjmuje estradiol pełni w organizmie funkcje ochraniające komórki ośrodkowego układu nerwowego i przeciwdziała rozwojowi degeneracji komórek nerwowych o różnej etiologii (Brann i wsp. 2007).

Do oceny funkcji poznawczych wykorzystano baterię testów komputerowych CNS Vital Signs. Przewagą zastosowania komputerowych testów w porównaniu z konwencjonalnymi testami neuropsychologicznymi, jest uzyskiwanie wyników, które spełniają kryteria porównywalności.

Przy pomocy aparatury diagnostycznej CNS-VS można przeprowadzić następujące testy: pamięci werbalnej, funkcjonowania motorycznego, test Stroopa, test przerzucania uwagi oraz test ciągłości zadaniowej. Za ich pomocą możemy oceniać 9 podstawowych funkcji poznawczych: pamięć (słowną i wzrokową), szybkość przetwarzania, funkcje wykonawcze, szybkość psychomotoryczną, czas reakcji, skupianie uwagi oraz plastyczność poznawczą. Na podstawie pięciu z tych funkcji: pamięci, szybkości psychomotorycznej, czasu reakcji, skupiania uwagi i plastyczności poznawczej, jest obliczany tzw. indeks neurokognitywny (*Neurocognition Index* – NCI) charakteryzujący zdolności poznawcze pacjenta (Gualtieri i Johnson 2006). Była to pierwsza praca [5], oceniająca w sposób kompleksowy funkcje poznawcze u pomenopauzalnych kobiet za pomocą tego aparatu poznawczego u osób z niskim poziomem homocysteiny (Hct) (<9  $\mu\text{M/l}$ ); normalnym (9–15  $\mu\text{M/l}$ ) i podwyższonym (>15  $\mu\text{M/l}$ ).

W wyniku przeprowadzonych testów wykazano, że hiperhomocysteinemia (>15  $\mu\text{M/l}$ ) u kobiet po menopauzie może być łączona ze zwiększonym ryzykiem spadku niektórych funkcji poznawczych takich jak: funkcje wykonawcze (tj. konkretne procesy kontroli poznawczej, mające odpowiadać za najbardziej złożone, świadome i inteligentne reakcje

organizmu); skupianie uwagi (tj. zdolności do skupienia uwagi na jednym, wybranym aspekcie otoczenia); plastyczność poznawcza (tj. zdolność do przełączania się między alternatywnymi sposobami reagowania). Stwierdzono również znacznie niższy indeks neurokognitywny NCL u kobiet z hiperhomocysteinemią w porównaniu z kobietami z niskim poziomem Hct.

Ponadto, wykazano, że genotyp APOE  $\epsilon 4/\epsilon 4$  występował znacznie częściej (15,5%) u kobiet z hiperhomocysteinemią niż w grupach kobiet z niskim (0%) lub normalnym (1,9%) poziomem Hct. Wyniki te potwierdzają znany fakt, że obecność apoE4, stanowi czynnik ryzyka rozwoju zaburzeń poznawczych i otępienia i zachęciły nas do zbadania kwestii czy i które z funkcji poznawczych (badanych przez CNS-VS) zależą od polimorfizmu genu APOE. Ponadto zbadaliśmy również korelacje pomiędzy takimi czynnikami jak profil lipidowy (Triglicerydy-TG, Cholesterol, LDL-cholesterol i HDL-cholesterol), BMI i zmiana masy ciała, które to cechy są czynnikami wzrostu ryzyka wystąpienia zaburzeń poznawczych i badanymi funkcjami poznawczymi u kobiet po menopauzie oraz czy zależą one od polimorfizmu genu APOE [6].

Stwierdziliśmy, że spośród badanych funkcji poznawczych, trzy: funkcjonowanie wykonawcze, szybkość psychomotoryczna i plastyczność poznawcza oraz poziom TG w znacznym stopniu zależą od polimorfizmu genu APOE. Przy czym osoby posiadające allel  $\epsilon 2/\epsilon 3$  osiągały najlepsze wyniki w odniesieniu do wyżej wymienionych funkcji, ale już nosiciele allelu  $\epsilon 3/\epsilon 3$  uzyskiwali średnio o ok. 10 pkt. wynik gorszy, wskazujący na niską ocenę tych funkcji poznawczych. Nie stwierdzono jednak wpływu polimorfizmu genu APOE na indeks neurokognitywny NCI ( $p < 0.083$ ) oraz pozostałych funkcji poznawczych, jak i na poziomie innych lipidów. Wiek oraz BMI nie zależał od nosicielstwa badanych alleli APOE. Ponadto wykazaliśmy, że NCI oraz takie funkcje poznawcze jak: pamięć, szybkość przetwarzania, funkcjonowanie wykonawcze, szybkość psychomotoryczna, skupianie uwagi i plastyczność poznawcza zależy od zmian w masie ciała oraz między BMI i pamięcią wzrokową jak i między poziomem cholesterolu i plastycznością poznawczą u kobiet po menopauzie .

**F.** Ocena roli homocysteiny lipidów i antyoksydacyjnych witamin jako biomarkerów ryzyka choroby Alzheimera (AD), w porównaniu z chorobą demencyjną typu niealzheimerowskiego, *badania w populacji osób z demencją [7]*.

**G.** Ocena roli endogennych antyoksydantów (albuminy, bilirubiny, kwasu moczowego i glutadionu) u pacjentów z deficytami poznawczymi i bez zaburzeń poznawczych, *badania w populacji osób z demencją [8]*.

Ostatnie w cyklu prace [7, 8] dotyczą badań przeprowadzonych w populacji osób z chorobą demencyjną (64 osoby) o różnej etiologii, w tym ze zdiagnozowaną chorobą Alzheimera (AD), którzy zostali zrandomizowani z regionu lubelskiego. Środowisko bytowania ludzi znacząco wpływa na czynniki oraz stopień ryzyka rozwoju i wystąpienia chorób otępiennych dlatego te pilotażowe badania osób z Lubelszczyzny mogą być przydatne.

Z uwagi na niewielką liczbę osób uczestniczących w poszczególnych grupach badanych i zastosowaną metodykę badań, otrzymane wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych pogłębionych badań w tym zakresie.

Choroba otępienna została określona na podstawie klinicznych kryteriów DSM-IV, natomiast choroba Alzheimera (AD) na podstawie kryteriów NINCDS-ADRDA, Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego.

Test Mini-Mental State Examination (MMSE) użyto do badań przesiewowych (Folstein i Folstein, 1975) i osoby z wynikami MMSE < 26 pkt. uznano jak osoby z chorobą demencyjną (Vidovich i wsp. 2009).

W publikacji [7] analizowano biochemiczne markery ryzyka chorób neurodegeneracyjnych: homocysteinę (Hct) oraz mające z nią związek witaminy B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> i kwas foliowy; lipidy (TG, cholesterol, HDL-cholesterol); antyoksydacyjne witaminy A i E oraz takie czynniki jak wiek, wykształcenie, miejsce zamieszkania. Grupy badane stanowiły osoby z chorobą demencyjną (DP) ale z wykluczoną AD (n-ADP), oraz pacjenci demencyjni ze zdiagnozowaną AD (ADP). Kontrolę stanowiły osoby bez demencji (MMSE>28).

Nie stwierdzono znaczących różnic między populacją osób demencyjnych i grupą osób zdrowych, z wyjątkiem poziomu cholesterolu i witaminy A.

Natomiast pomiędzy dwiema grupami pacjentów z otępieniem zaznaczyły się już znaczące różnice. Osoby z AD były starsze, podawały prawie dwukrotnie dłuższy okres trwania otępienia, miały znacznie niższy wynik MMSE oraz charakteryzowały się niższym poziomem Hct i witaminy E. Co więcej, stwierdzono istotną zależność między poziomem witamin E i A oraz poziomem Hct i wartością MMSE, ale tylko u pacjentów z demencją bez AD, u osób z AD ta zależność już nie wystąpiła.

W następnej pracy [8], zbadaliśmy czy zmniejszona efektywność obrony antyoksydacyjnej jest związana ze spadkiem zdolności poznawczych ocenianej skalą MMSE u pacjentów z otępieniem (DP-s).

DP-s zostali podzielone wg Tombaugh et al.,(1992) na dwie grupy: CIDP - pacjenci z zaburzeniami funkcji poznawczych (MMSE ≤ 18) i NCFDP - pacjenci bez znacznych zaburzeń poznawczych (MMSE 18-30). Średnia wartość wskaźnika MMSE w pierwszej grupie wyniosła 12.6 ± 4.7 pkt.; w drugiej 24.2 ± 3.5 pkt. Stwierdziliśmy, że osoby z zaburzeniami funkcji poznawczych miały znacznie niższy poziom antyoksydantów w osoczu, takich jak glutadion, albumina, bilirubina i kwas moczowy i w porównaniu do grupy kontrolnej, jak również do tych bez znacznych deficytów poznawczych, z wyjątkiem glutadionu. Wyniki te potwierdzają hipotezę że obniżony poziom przeciwutleniaczy może stanowić czynnik ryzyka pogłębiania się zaburzeń poznawczych u osób z otępieniem.

#### LITERATURA:

1. Alexopoulos P, Topalidis S, Irmisch G et al. Homocysteine and cognitive function in geriatric depression. *Neuropsychobiology* 2010; 61 (2):97-104.

2. Auman JT, Seidler FJ, Slotkin TA. Neonatal chlorpyrifos exposure targets multiple proteins governing the hepatic adenylyl cyclase signaling cascade: Implications for neurotoxicity. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000; 121(1):19-27.
3. Bjørling-Poulsen M, Andersen HP, Grandjean P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ Health.* 2008; 7:1-20, Review.
4. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C et al. Neurotrophic and Neuroprotective Actions of Estrogen: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Steroids.* 2007; 72(5): 381-405.
5. Caselli RJ. Phenotypic differences between apolipoprotein E genetic subgroups: research and clinical implications. *Alzheimers Res Ther.* 2012; 4(3):20-23.
6. Caughlan A, Newhouse K, Namgung U, Xia Z. Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases. 2004, *Toxicolo Sci.* 2004; 78:125–34.
7. Clement JG. Central activity of acetylcholinesterase oxime reactivators. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992; 12: 104-9.
8. Crumpton TL, Seidler FJ, Slotkin TA. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vitro and in vivo: Effects on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation. *Brain Res.* 2000; 857:87-98.
9. Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *J Clin Invest.* 2004;114(1):23-7.
10. Eyer P. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol Rev.* 2003; 22:165–90.
11. Folstein MF, Folstein SE. “Mini-Mental State:” a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975; 2: 189–198.
12. Gualtieri CT, Johnson LG. Reliability and validity of computerized neurocognitive test battery, CNS Vital Signs. *Arch Clin Neuropsychol.* 2006; 21:623-43.
13. Hachisu M, Konishi K, Hosoi M, et al. Hypothesis of Serum Anticholinergic Activity in Alzheimer's Disease: Acetylcholine Neuronal Activity Modulates Brain-Derived Neurotrophic Factor Production and Inflammation in the Brain. *Neurodegener Dis.* 2015;15(3):182-7.
14. Hasegawa T, Matsuzaki M, Takeda M et al. Increased dopamine and its metabolites in SHSY5Y neuroblastoma cell that express tyrosinase. *J. Neurochem.* 2003; 87:470-75.
15. Lane RM, Potkin SG, Enz A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2006; 9(1):101-24.
16. Lotti M. Cholinesterase Inhibition: Complexities in Interpretation. *Clin Chem.* 1995; 41:1814-18.
17. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1833(12):3448-59.
18. Park JH, Lee JE, Shin IC, Koh HC. Autophagy regulates chlorpyrifos-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 268:55-67.
19. Permoda-Osip A, Kisielewski J, Dorszewska J, Rybakowski J. Homocysteina a funkcje poznawcze w depresji w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej. *Psychiatr Pol.* 2014; 48(6):1117–1126.
20. Prentice H, Modi JP, Wu JY. Mechanisms of Neuronal Protection against Excitotoxicity, Endoplasmic Reticulum Stress, and Mitochondrial Dysfunction in Stroke and Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015:1-7.
21. Ravaglia G, Forti P, Maioli F et al. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutrition.* 2005; 82(3): 636–643.
22. Reyes AE, Chacón MA, Dinamarca MC et al. Acetylcholinesterase-Abeta complexes are more toxic than Abeta fibrils in rat hippocampus: effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis, and neuronal cell loss. *Am J Pathol.* 2004;164(6):2163-74.
23. Richardson RJ. Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: a critical review of the literature. *J Toxicol Environ Health.* 1995; 44(2):135-65.
24. Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect.* 2005; 13: 23-36.

25. Singh AK, Tiwari MN, Prakash O, Singh MP. A current review of cypermethrin-induced neurotoxicity and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol.* 2012; 10(1): 64-71.
26. Terry AV, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 306: 821-824.
27. Tombaugh TN, McIntyre NJ. The mini-mental state examination: a comprehensive review. *J Am Geriatr Soc.* 1992; 40: 922–935.
28. Tsokos MS, Scarpa RA, Ross TJ et al. Differentiation of human neuroblastoma recapitulates neural crest development. Study of morphology, neurotransmitter enzymes, and extracellular matrix proteins. *Am J Pathol.* 1987; 128: 484-96.
29. Vidovich MR, Lautenschlager NT, Flicker L et al. The PACE Study: A randomised clinical trial of cognitive activity (CA) for older adults with mild cognitive impairment (MCI). *Trials.* 2009; 14:10 – 114.
30. Wang A, Costello S, Cockburn M et al. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. *Eur J Epidemiol.* 2011; 26(7):547-55.
31. Zaganas I, Kapetanaki S, Mastorodemos V et al. Linking pesticide exposure and dementia: what is the evidence? *Toxicology.* 2013; 307:3–11.

#### IV. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych (po doktoracie)

Od 2008 roku rozpoczęła się moja współpraca z zespołem Zakładu Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Celem naszych podjętych badań było zbadanie i określenie profilu farmakologicznego kombinacji między poszczególnymi lekami przeciwpadaczkowymi (LPP) lub LPP i wybranymi preparatami, w tym lekami podawanymi w przyczyn innych niż padaczka, w doświadczalnych modelach padaczki u myszy. W badaniach przedklinicznych na zwierzętach, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdziliśmy:

- Imperatorina (naturalny związek izolowany z arcydzięgla) może poprawić profil farmakologiczny lamotryginy (LTG) zwiększając jej działanie przeciwdrgawkowe oraz nie wpływając na występowanie działań niepożądanych [**pub.11**].
- W szerokich badaniach mających określić profil farmakologiczny retigabiny (RTG) w połączeniu z LPP: karbamazepiną (CBZ) lamotryginą (LTG) i kwasem walproinowym (VPA) ustalono, że zarówno połączenie RTG z VPA jak i CBZ z LTG może być korzystne dla pacjentów z padaczką, opornych na działanie obecnie dostępnych LPP. Ponadto, brak interakcji farmakokinetycznych RTG z badanymi LPP oraz brak ostrych działań niepożądanych czyni te kombinacje wartymi poddania weryfikacji klinicznej [**pub.12**].
- Po przeprowadzonej analizie izobolograficznej interakcji endogennej pochodnej tetraizochinoliny, naturalnego związku występującego w mózgu (MeTHIQ) z 4 nowymi LPP: LTG, okskarbazepiną (OXC), pregabaliną (PGB) i topiramatem (TPM) [**pub.14**] oraz klonazepamem (CZP), etosuksymidem (ETS), gabapentyną (GBP), lewetyracetamem (LEV), tiagabiną (TGB) i wigabatryną (VGB) [**pub. 18**], w teście MES u myszy, stwierdzono, że THIQ synergicznie współdziała z TPM (w proporcjach 1:3, 1:1 i 3:1) oraz, że obserwowana interakcja była farmakodynamiczna. Kombinacje MeTHIQ z pozostałymi LPP, także mogą okazać się korzystne z powodu zmniejszenia dawek LPP

bez utraty ich przeciwdrgawkowych właściwości. Ponadto, wykazano, że kombinacje MeTHIQ z OXC, LTG i PGB nie wykazywały ostrych działań niepożądanych u zwierząt [pub.14].

Wyniki przedstawione w kolejnej pracy [pub. 18] pokazują, że w określonych proporcjach synergiczne działanie występuje przy łącznym podawaniu MeTHIQ z CZP, ETS i GBP, które wydają się być szczególnie korzystne z punktu widzenia klinicznego. Ponadto wykazano, że inne kombinacje MeTHIQ z CZP, ETS, LEV, VGB i TGB wydają się być neutralne i warte rozważenia w badaniach klinicznych [pub.18].

Celem kolejnych prac było zbadanie wpływu leków wpływających na układ renina-angiotensyna tj. inhibitorów konwertazy angiotensyny ACE (kaptopryl, enalapryl i perindopryl) oraz antagonistów receptora AT<sub>1</sub> dla angiotensyny II (losartan, telmisartan i kandesartan) i diuretyków na przeciwdrgawkowe działania leków przeciwpadaczkowych.

- Badanie wpływu kaptoprylu na przeciwdrgawkowe działanie LPP: CBZ, fenytoiny [PHT], VPA, fenobarbitalu [PB], OXC, LTG i TPM w teście MES u myszy, wykazało zwiększony efekt ochronny dla LTG i CBZ [pub.15]. Podobne działanie w stosunku do LTG, ale nie do OXC i TPM, stwierdzono również w przypadku drugiego inhibitora-enalaprylu [pub.16].  
Wykazano również, że kaptopryl i enalapryl nie miały wpływu na przeciwdrgawkowe działanie gabapentyny (GBP) [pub.17] oraz LEV i VGB (kaptopryl) [pub. 19, 32]. Natomiast peryndopryl pozytywnie wpływał na przeciwdrgawkowe działanie LEV [pub.19] oraz nie podwyższał przeciwdrgawkowej aktywności VGB [pub.32].
- Podaliśmy również, że losartan zwiększał w osoczu i mózgu stężenie GBP oraz podwyższał próg drgawkowy dla GBP [pub.17]. Efektu tego nie zaobserwowano, kiedy losartan był stosowany razem z LEV [pub.19] albo VGB [pub.32]. Ponadto, telmisartan, inny antagonist receptoru AT<sub>1</sub>, nie powodował zwiększonego działania przeciwdrgawkowego GBP [pub.17] jak również LEV [pub. 19].  
Trzeci z badanych antagonistów receptora AT<sub>1</sub> - kandesartan oraz przebadane dwa leki moczopędne: hydrochlorotiazyd i kwas etakrynowy nie wpływały na przeciwdrgawkową aktywność LEV [pub. 19] oraz VGB [pub.32].
- Ponadto, badania behawioralne wykazały, że jedynie losartan podawany z GBP powodował negatywne efekty uboczne w postaci zaburzeń koordynacji ruchowej u myszy [pub.17], pozostałe kombinacje leków działających na układ sercowo-naczynowy i LPP nie zaburzały koordynacji ruchowej i pamięci długotrwałej u zwierząt [pub.15,16,17,19].

Ponadto, we współpracy z zespołem z Zakładu Fizjologii Zwierząt UMCS w Lublinie badaliśmy wpływ na przeciwdrgawkowe właściwości VPA i LEV dwóch flawonoidów rutyny i kwercetyny, związków obecnych w preparatach farmaceutycznych i suplementach diety w różnych modelach drgawek [21].

- Nasze wyniki wykazały jedynie słaby przeciwdrgawkowy potencjał badanych flawonoidów. Ponadto, stwierdzono brak istotnych interakcji pomiędzy kwercetyną i badanymi lekami przeciwpadaczkowymi, co sugeruje, że jednoczesne podawanie tych leków z badanymi flawonoidami jest całkowicie bezpieczne.

Inne ważniejsze opublikowane prace dotyczyły:

- oddziaływania leptyny, hormonów płciowych i kwasu  $\alpha$ -ketoglutarynowego na metabolizm kostny (markery obrotu kostnego) u kobiet po menopauzie [13].
- wpływu naturalnego oleju (wyciągu oliwy z oliwek) na markery obrotu kostnego u kobiet po menopauzie z osteopenią [22].