

Wrocław, 9.04.2023 r.

Dr hab. n. med. Sławomir Budrewicz, prof. UM

Katedra i Klinika Neurologii Uniwersytetu Medycznego

im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

**Ocena dorobku naukowego doktora Mirosława Zagaji
z Samodzielnej Pracowni Analiz Izobolograficznych Instytutu Medycyny Wsi
im. Witolda Chodźki w Lublinie**

1. Przebieg pracy zawodowej:

Dr nauk biologicznych Mirosław Zagaja ukończył w 2007 roku studia na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej (UMCS) w Lublinie, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, uzyskując tytuł zawodowy magistra biotechnologii po obronie pracy magisterskiej pt.: „Odporność przeciwważna typu lizozymu przeciwko *Mycobacterium smegmatis* w jelicie środkowym i płynie jamy ciała”. Wcześniej, w 2006 roku uzyskał tytuł zawodowy magistra biologii, także na UMCS w Lublinie, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, po obronie pracy: „Kusakowate (Coleoptera; Staphylinidae) gniazd mrówek okolic Leżajska”. W latach 2007-2011 był doktorantem w Zakładzie Zoologii, Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS w Lublinie. W 2012 roku uzyskał stopień naukowy doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia po obronie rozprawy doktorskiej: „Morfologia stadiów rozwojowych, biologia oraz wybrane aspekty genetyki populacyjnej myrmekofilnego gatunku *Thiasophila angulata* (Erichson, 1837) (Coleoptera; Staphylinidae)”. W latach 2012-2016 pracował jako asystent w Samodzielnej Pracowni Analiz Izobolograficznych w Instytucie Medycyny Wsi w Lublinie, a od 2016 roku do chwili obecnej pracuje jako adiunkt w Samodzielnej Pracowni Analiz Izobolograficznych tego Instytutu.

2. Działalność dydaktyczna i organizacyjna:

W ramach działalności dydaktycznej, jako uczestnik studiów doktoranckich w Zakładzie Zoologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS w Lublinie Habilitant prowadził zajęcia z następujących przedmiotów: „Zoologia ogólna i systematyczna” na kierunku - biologia, specjalność nauczanie biologii i chemii - ćwiczenia laboratoryjne; ćwiczenia terenowe z zoologii na kierunku - biologia. Po zatrudnieniu w Instytucie Medycyny Wsi jego działalność dydaktyczna ogniskowała się przede wszystkim na opiece i koordynowaniu prac badawczych doktorantów (jako promotor pomocniczy), a także jako opiekun stażu.

Od 2012 roku jest członkiem Polskiego Towarzystwa Entomologicznego, a w latach 2012-2018 był członkiem Lubelskiego Towarzystwa Wspierania Nauk Farmaceutycznych. W latach 2009-2011 był przewodniczącym Wydziałowej Rady Samorządu Doktorantów Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS, a w latach 2009-2010 członkiem Senackiej Komisji Badań Naukowych UMCS. Poza tym w latach 2010-2011 sprawował funkcję członka Komisji Dyscyplinarnej dla Doktorantów tej uczelni.

W ramach działań popularyzujących naukę czynnie uczestniczył w konferencjach krajowych i międzynarodowych. Recenzował prace publikowane w czasopismach krajowych i zagranicznych (między innymi w: *Antioxidants*, *Toxins*, *Folia Neuropathologica*, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine (AAEM)*, *Neuroscience Letters*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, a także *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*).

3. Dorobek naukowy i działalność naukowa:

Łączny Impact Factor publikacji Habilitanta wynosi: 139,938 punktów, w tym prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora: 134,899. Liczba cytowań według bazy Web of Science Core Collection (bez autocytowań) wynosi: 289. Indeks Hirscha według bazy Web of Science Core Collection: 12. Łączna liczba punktów MNiE wynosi: 3255,00, w tym po uzyskaniu stopnia doktora: 3157,00 pkt.

Habilitant otrzymał w 2016 roku Nagrodę Dyrektora Instytutu Medycyny Wsi za działalność naukową. W okresie studiów w 2009 roku otrzymał nagrodę główną za pracę pt.: „Biochemiczna i molekularna identyfikacja bakterii jelitowej z *Dendrobaena veneta* (Annelida)

wykazującej aktywność przeciwpłatkową” podczas konferencji naukowej „Mikrobiologia w medycynie, przemyśle i ochronie środowiska” zorganizowanej pod patronatem Komitetu Mikrobiologii PAN i Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Otrzymał Stypendium Rektora UMCS w Lublinie dla doktorantów przyznane na rok akademicki w latach 2010-2011 za najlepsze wyniki w nauce na kierunku - biologia.

Habilitant brał udział w projektach finansowanych przez NCN – w 1 jako kierownik, w 5 jako wykonawca, a także prowadzonych w ramach działalności statutowej Instytutu Medycyny Wsi, w dwóch jako wykonawca, w 2 jako uczestnik.

4. Omówienie osiągnięć naukowych, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”.

Osiągnięcie naukowe Habilitant zatytułował: "Wpływ wybranych kumaryn na ochronne działanie leków przeciwpadaczkowych w doświadczalnych modelach padaczki". Obejmuje ono cykl 5 prac opublikowanych w czasopismach z Listy Filadelfijskiej [łączny IF: 15,311; MNiSW: 285]. We wszystkich publikacjach Habilitant był pierwszym autorem, a w trzech również autorem korespondencyjnym. Poniżej wymieniono prace wchodzące w skład cyklu.

1. Zagaja M, Pyrka D, Skalicka-Wozniak K, Głowniak K, Florek-Luszczki M, Glensk M, Luszczki JJ. Effect of xanthotoxin (8-methoxypsoralen) on the anticonvulsant activity of classical antiepileptic drugs against maximal electroshock-induced seizures in mice. *Fitoterapia*, 2015, 105, 1–6.[IF: 2,408; MNiSW: 25]
2. Zagaja M, Andres-Mach M, Patrzyłas P, Pyrka D, Szpringer M, Florek-Łuszczki M, Żółkowska D, Skalicka-Woźniak K, Łuszczki JJ. Influence of xanthotoxin (8-methoxypsoralen) on the anticonvulsant activity of various novel antiepileptic drugs against maximal electroshock-induced seizures in mice. *Fitoterapia*, 2016, 115, 86–91. [IF:2,698; MNiSW: 30]
3. Zagaja M, Bryda J, Szewczyk A, Szala-Rycaj J, Łuszczki JJ, Walczak M, Kuś K, Andres-Mach M. Xanthotoxin enhances the anticonvulsant potency of levetiracetam and valproate in the 6-Hz corneal stimulation model in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2022, 36, 133-142.[IF: 2,748; MNiSW:70]

4. Zagaja M, Andres-Mach M, Skalicka-Woźniak K, Rękas AR, Kondrat-Wróbel MW, Gleńsk M, Łuszczki JJ. Assessment of the Combined Treatment with Umbelliferone and Four Classical Antiepileptic Drugs Against Maximal Electroshock-Induced Seizures in Mice. *Pharmacology*, 2015, 96, 175–180. [IF: 1,533; MNiSW: 20]
5. Zagaja M, Zagaja A, Szala-Rycaj J, Szewczyk A, Lemieszek MK, Raszewski G, Andres-Mach M. Influence of Umbelliferone on the Anticonvulsant and Neuroprotective Activity of Selected Antiepileptic Drugs: an In Vivo and In Vitro Study. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23, 3492. [IF: 5,924; MNiSW: 140]

Padaczka jest jednym z najczęstszych schorzeń układu nerwowego. W Polsce liczba chorych szacowana jest na około 400 000 osób. Schorzenie to jest przedmiotem zainteresowania specjalistów wielu dziedzin. Etiologia padaczki jest złożona, napady padaczkowe mogą być wynikiem wrodzonych wad strukturalnych, chorób genetycznych, czy metabolicznych, przebytych infekcji, uszkodzeń strukturalnych związanych z urazem, uszkodzeniem naczyniowym, chorobami układu odpornościowego oraz innych. Mimo stale zwiększającej się liczby leków przeciwpadaczkowych, u ponad 30% chorych, padaczka pozostaje oporna na leczenie. Z tego powodu istnieje nadal pilna potrzeba opracowania nowych leków posiadających lepsze właściwości przeciwpadaczkowe.

Wśród działań mających na celu lepszą kontrolę napadów padaczkowych w ostatnich latach zwraca się uwagę na działanie substancji pochodzenia naturalnego posiadających takie właściwości. Jednym z głównych obszarów działań naukowych Habilitanta była ocena potencjalnych właściwości przeciwpadaczkowych substancji pochodzenia naturalnego oraz ich oddziaływanie na leki przeciwpadaczkowe w modelach zwierzęcych padaczki. Wśród tych substancji Autor skoncentrował się na grupie kumaryn. Kumaryny są grupą metabolitów wtórnych roślin, powszechnie występującą w przyrodzie. Związki te posiadają szerokie spektrum działań farmakologicznych, w tym m.in.: działanie antykoagulacyjne, fotouczulające, przeciwbakteryjne i antyoksydacyjne. W modelach zwierzęcych padaczki wykazano również ich właściwości przeciwdrgawkowe.

Poniżej przedstawiono zwięzłe omówienie cyklu prac.

Habilitant przeprowadził szereg eksperymentów w celu oceny właściwości przeciwpadaczkowych ksantotoksyny i umbeliferonu oraz określenia ich wpływu na wybrane leki przeciwpadaczkowe.

1. Zagaja M, Pyrka D, Skalicka-Wozniak K, Głowniak K, Florek-Luszczki M, Glensk M, Luszczki JJ. *Effect of xanthotoxin (8-methoxypsoralen) on the anticonvulsant activity of classical antiepileptic drugs against maximal electroshock-induced seizures in mice. Fitoterapia, 2015, 105, 1–6.*

2. Zagaja M, Andres-Mach M, Patrzylas P, Pyrka D, Szpringer M, Florek-Luszczki M, Żółkowska D, Skalicka-Woźniak K, Luszczki JJ. *Influence of xanthotoxin (8-methoxypsoralen) on the anticonvulsant activity of various novel antiepileptic drugs against maximal electroshock-induced seizures in mice. Fitoterapia, 2016, 115, 86–91.*

W dwóch pierwszych pracach cyklu przedstawiono wpływ ksantotokosyny na aktywność leków przeciwpadaczkowych w modelu zwierzęcym. Celem pracy była ocena wpływu ksantotoksyny na działanie czterech klasycznych leków przeciwpadaczkowych - karbamazepiny (CBZ), fenobarbitalu (PB), fenytoiny (PHT) i kwasu walproinowego (VPA), a także leków nowszej generacji - lamotryginy (LTG), okskarbazepiny (OXC), topiramatu (TPM), lakozamidu (LCM) i pregabaliny (PGB) w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES). Test ten uważany jest za eksperymentalny model napadów toniczno-klonicznych oraz, w pewnym stopniu, napadów ogniskowych z wtórnym uogólnieniem lub bez uogólnienia u ludzi. Ten model padaczki eksperymentalnej jest podstawowym i pierwszym testem wykorzystywanym w celu identyfikacji związków o aktywności przeciwdrgawkowej. Podczas doświadczeń wykorzystano dorosłe osobniki samców myszy szczepu Swiss Albino. Drgawki toniczno-kloniczne wywoływano bodźcem elektrycznym o czasie trwania 0,2 s, napięciu 500 V i natężeniu 25 mA. Mysiom podawano dootrzewnowo wybrane LPP we wzrastających dawkach, osobno oraz w kombinacji ze stałymi podprogowymi dawkami XANT. Następnie na szczycie ich działania przeciwdrgawkowego dokonywano stymulacji prądem. W badaniach określono aktywność przeciwdrgawkową leków i ich kombinacji z XANT, poprzez wyznaczenie ich mediany dawek skutecznych w teście MES. Ponadto, przeprowadzono ocenę stężenia leków przeciwpadaczkowych w homogenatach mózgow

myszy, w celu potwierdzenia bądź wykluczenia profilu interakcji na poziomie farmakokinetycznym pomiędzy XANT, a badanymi lekami przeciwpadaczkowymi. Badania wykazały, że XANT w dawce podprogowej 100 mg/kg, zwiększała istotnie statystycznie działanie przeciwpadaczkowe CBZ i VPA, ale nie PB i PHT w teście MES u myszy. Natomiast XANT w dawce 50 mg/kg nie wpływała na działanie przeciwdrgawkowe PB, PHT i VPA w teście MES. Pomiar całkowitego stężenia LPP w homogenatach mózgow u myszy wykazał, że XANT w dawce 100 mg/kg podnosiła istotnie statystycznie całkowite stężenia CBZ i VPA, co wskazuje na farmakokinetyczny charakter interakcji między substancjami.

W drugiej publikacji, wykorzystując tą samą metodykę, przeprowadzona została ocena wpływu XANT na aktywność przeciwdrgawkową pięciu leków przeciwpadaczkowych (LCM, LTG, OXC, PGB i TPM). XANT (100 mg/kg, i.p.) znacznie nasilała przeciwdrgawkowe działanie LCM, OXC, PGB i TPM w teście MES poprzez zmniejszenie mediany dawek skutecznych. Ponadto XANT w dawce 50 mg/kg również znacząco wzmacniała przeciwdrgawkowe działanie LCM, PGB i TPM w teście MES u myszy. Stwierdzono, że XANT nasila przeciwdrgawkowe działanie CBZ i VPA, ale nie PHT i PB w teście MES u myszy. Korzystne działanie XANT na te dwa leki było prawdopodobnie spowodowane interakcjami farmakokinetycznymi, które powodowały zwiększenie całkowitego stężenia CBZ i VPA w mózgu badanych zwierząt. Z tego powodu zastosowanie XANT w roli dodatkowego leku lub substancji wpływającej na skuteczność działania ww. czterech klasycznych LPP wymaga dalszych badań z wykorzystaniem innych modeli padaczki eksperymentalnej. W podsumowaniu stwierdzono, że farmakodynamiczne zwiększenie przeciwdrgawkowego działania OXC i TPM przez XANT, przy braku działań niepożądanych, powoduje, że kombinacje tych leków powinny być oceniane jako potencjalnie korzystne w dalszych badaniach klinicznych.

3. Zagaja M, Bryda J, Szewczyk A, Szala-Rycaj J, Łuszczki JJ, Walczak M, Kuś K, Andres-Mach M. Xanthotoxin enhances the anticonvulsant potency of levetiracetam and valproate in the 6-Hz corneal stimulation model in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2022, 36(1):133-142.

W tej pracy, uwzględniając uzyskane wyniki wspólnego stosowania XANT i wybranych LPP kontynuowano badania poszerzając model padaczki eksperymentalnej o test drgawek psychoruchowych 6 Hz (32 mA), który jest eksperymentalnym modelem napadów ogniskowych u ludzi. Stereotypowe i behawioralne objawy aktywności napadowej u zwierząt

poddanych stymulacji elektrycznej prądem, o częstotliwości 6 Hz i natężeniu 32 mA, są podobne do tych obserwowanych u pacjentów z ogniskowymi napadami padaczkowymi. Celem pracy była ocena wpływu XANT na działanie 4 wybranych leków przeciwpadaczkowych (LCM, LEV, PB, VPA) w modelu drgawek psychoruchowych u myszy. Przeanalizowano działania niepożądane XANT przy stosowaniu z wybranymi lekami przeciwpadaczkowymi w testach behawioralnych: teście komina (ocena koordynacji ruchowej), biernego unikania (ocena pamięci długotrwałej) oraz chwytania (ocena siły mięśni szkieletowych). Ponadto oceniono stężenia leków przeciwpadaczkowych w homogenatach mózgow myszy, w celu potwierdzenia lub wykluczenia profilu interakcji na poziomie farmakokinetycznym pomiędzy XANT i badanymi lekami przeciwpadaczkowymi. W badaniu wykorzystano dorosłe osobniki samców myszy szczepu Swiss Albino. Drgawki psychoruchowe wywoływano poprzez elektrody rogówkowe. Charakteryzują się one m.in. 2-3 sekundową aktywnością ruchową, po której następuje faza bezruchu w pozycji stojącej. Ponadto, pojawiają się automatyzmy kończyn przednich z drgawkami klonicznymi, ruchy wąsów i wymuszona pozycja ogona. Efektem końcowym podczas stymulacji prądem, po podaniu leków, jest ochrona przed drgawkami, którą stwierdzano w sytuacji, gdy zwierzę wracało do naturalnej aktywności poznawczej w ciągu 30 sekund od stymulacji prądem. XANT w dawce 50 mg/kg istotnie statystycznie podnosiła przeciwdrgawkowe działanie, zarówno LEV jak i VPA. XANT podnosiła stężenie VPA w mózgu badanych zwierząt, co świadczy o farmakokinetycznym charakterze interakcji, w przypadku LEV stwierdzono interakcję farmakodynamiczną, ponieważ XANT nie zmieniała stężenia tego leku u myszy. W podsumowaniu wskazano, że zastosowanie XANT w połączeniu z LEV, przy jednoczesnym braku skutków ubocznych i niekorzystnych interakcji farmakokinetycznych, jest korzystne z klinicznego punktu widzenia. Konieczne są dalsze badania w celu określenia mechanizmu molekularnego działania i oceny długoterminowej bezpieczeństwa klinicznego stosowania tych substancji.

4. Zagaja M, Andres-Mach M, Skalicka-Woźniak K, Rękas AR, Kondrat-Wróbel MW, Gleńsk M, Łuszczki JJ. Assessment of the Combined Treatment with Umbelliferone and Four Classical Antiepileptic Drugs Against Maximal Electroshock-Induced Seizures in Mice. *Pharmacology*, 2015, 96(3-4), 175–180.

W badaniu oceniono działanie umbeliferonu w skojarzeniu z lekami przeciwpadaczkowymi w modelu zwierzęcym. Celem pracy było określenie wpływu UMB na

ochronne działanie 4 klasycznych LPP (CBZ, PB, PHT i VPA) w teście MES u myszy. Zmierzono także wpływ UMB na całkowite stężenia LPP w mózgach badanych zwierząt w celu określenia, czy obserwowane efekty w tym modelu padaczki eksperymentalnej miały charakter farmakodynamiczny i/lub farmakokinetyczny. W podsumowaniu podkreślono, że selektywne wzmacnianie przeciwdrgawkowego działania PB i VPA przez UMB przy braku jakichkolwiek interakcji farmakokinetycznych między lekami powoduje, że połączenie UMB z PB lub VPA można w przyszłości rozważyć u pacjentów z padaczką oporną na standardowe leczenie przeciwpadaczkowe.

5. Zagaja M, Zagaja A, Szala-Rycaj J, Szewczyk A, Lemieszek MK, Raszewski G, Andres-Mach M. Influence of Umbelliferone on the Anticonvulsant and Neuroprotective Activity of Selected Antiepileptic Drugs: an In Vivo and In Vitro Study. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3492.

Celem pracy była ocena wpływu umbeliferonu (UMB) na działanie czterech leków przeciwpadaczkowych (LCM, LEV, PB, VPA) w teście drgawek psychoruchowych będącym eksperymentalnym modelem padaczki ogniskowej u ludzi. Przeprowadzono również analizę działań niepożądanych UMB podczas stosowania z badanymi lekami, w wybranych testach behawioralnych. Oceniono również stężenia leków w homogenatach mózgow myszy, w celu określenia profilu interakcji na poziomie farmakokinetycznym między UMB a badanymi LPP. Uwzględniając właściwości neuroprotektoryjne UMB przeprowadzono ocenę właściwości neuroprotektoryjnych UMB oraz jego kombinacji z wybranymi LPP w dwóch modelach neurodegeneracji *in vitro*. Wyniki badania wskazują na korzystny wpływ UMB na żywotność neuronów, potwierdzając właściwości neuroprotektoryjne tej kumaryny. UMB w stężeniu 2.5 i 5 $\mu\text{g/mL}$ powodował wzrost aktywności metabolicznej neuronów. Ponadto w najwyższym stężeniu kumaryna ta istotnie statystycznie neutralizowała toksyczny wpływ glutamianu na hodowlę neuronów. LEV, PB i VPA w najwyższych badanych stężeniach (5 $\mu\text{g/mL}$) obniżały żywotność neuronów. Z kolei, LCM, LEV i PB skutecznie zwiększały żywotność komórek nerwowych, zarówno w warunkach stresu troficznego, jak i w obecności glutamianu. Spośród badanych leków tylko VPA nie wykazywał właściwości neuroprotektoryjnych w obu zastosowanych modelach neurodegeneracji *in vitro*. Uzyskane wyniki wskazują, że UMB podany w dawce 1 $\mu\text{g/mL}$ (dawka, która nie zwiększa istotnie statystycznie żywotności komórek nerwowych w obu modelach neurodegeneracji) w kombinacji z wybranymi LPP łagodził negatywny wpływ wspomnianych leków na żywotność neuronów. UMB podnosił neuroprotektoryjne właściwości wszystkich badanych leków w warunkach stresu troficznego, a

także wzmacniał istotnie statystycznie neuroprotektoryjne właściwości PB ($p < 0,05$) oraz VPA ($p < 0,001$) w modelu ekscytotoksyczności, wywołanej podaniem glutaminianu w porównaniu do hodowli neuronów z samym lekiem. Przeprowadzone badania wykazały, że stosowanie UMB w połączeniu z PB i VPA, jest korzystne z klinicznego punktu widzenia. Poza tym UMB zwiększał właściwości neuroprotektoryjne PB oraz VPA w obu zastosowanych modelach *in vitro*.

5. Podsumowanie recenzji

Przedstawiony cykl prac realizuje przemyślany program badań dotyczących istotnego w farmakoterapii padaczki tematu wpływu wybranych kumaryn na działanie i bezpieczeństwo stosowania leków przeciwpadaczkowych w modelu zwierzęcym. W kolejnych pracach obserwuje się wyraźny rozwój metodologii badań stosowanych przez Habilitanta. Jego dorobek naukowy jest znaczny, wnosi istotny wkład w rozwój badań eksperymentalnych, między innymi w opisaną powyżej dziedzinie.

Dr n. biol. Mirosław Zagaja jest dojrzałym pracownikiem naukowym, w sposób konsekwentny budującym swój warsztat badawczy oraz umiejętnie planującym badania naukowe. Wykazuje się także zdolnością współpracy w organizacji badań wielośrodkowych, a także aktywnością w zakresie edukacyjnym.

Biorąc powyższe pod uwagę uważam, że dr n. biol. Mirosław Zagaja spełnia w sposób należyty wszystkie wymagania określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. Z 2020 r. poz. 85, 374, 695, 875, 1086) i może zostać dopuszczony do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki o zdrowiu.

Dr hab. n. med. Sławomir Budrewicz
prof. nadzw.
specjalista neurolog
2474065



Dr hab. n. med. Sławomir Budrewicz, prof. UM