



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM

Autoreferat przedstawiający opis osiągnięć naukowych

Agnieszka Gunia-Krzyżak

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Organicznej
Zakład Chemii Bioorganicznej

Kraków 2019

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....	4
3. Zatrudnienie w jednostkach naukowych	4
4. Doświadczenie zdobyte w ośrodkach zagranicznych.....	5
5. 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.).....	6
5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	6
5.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	6
5.3. Prezentacja wyników stanowiących postawę habilitacji.....	9
5.3.1. Wprowadzenie	9
5.3.1.1. Charakterystyka padaczki	10
5.3.1.2. Charakterystyka urazowego uszkodzenia mózgu	11
5.3.1.3. Charakterystyka bólu neuropatycznego	13
5.3.1.4. Poszukiwanie nowych leków w padaczce, urazowym uszkodzeniu mózgu i bólu neuropatycznym	14
5.3.2. Założenia i cel pracy	15
5.3.3. Wyniki badań i dyskusja.....	21
5.3.4. Podsumowanie	45
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	48
6.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora	48
6.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.....	51
6.3. Podsumowanie całego dorobku naukowego	58
7. Piśmiennictwo	59

1. Imię i nazwisko

Agnieszka Gunia-Krzyżak

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2013 doktor nauk farmaceutycznych (zakres: chemia leków), Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie. Tytuł rozprawy doktorskiej: „**Struktura a aktywność przeciwdrgawkowa w grupie pochodnych aminoalkanoli**”. Promotor: prof. dr hab. Henryk Marona

2008 magister farmacji (kierunek apteczny) Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie. Tytuł pracy magisterskiej: „**Otrzymywanie metabolitów denbufiliny metodą mikrobiologiczną**”. Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Pękala

3. Zatrudnienie w jednostkach naukowych

2015 - do chwili obecnej adiunkt w Pracowni Chemii Kosmetycznej Zakładu Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

2010 - 2015 asystent w Pracowni Chemii Kosmetycznej Zakładu Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

4. Doświadczenie zdobyte w ośrodkach zagranicznych

Po uzyskaniu stopnia doktora:

2015 National Dong Hwa University, **Hualien, Tajwan**, tygodniowa wizyta studyjna w zakresie współpracy naukowej (opiekun: prof. David Shiuan)

2014- 2015 Instytut Neuroimmunologii Klinicznej (Institute of Clinical Neuroimmunology), Uniwersytet Ludwika i Maksimiliana, **Monachium, Niemcy**, sześciomiesięczny staż w ramach projektu „Skills-Staże” finansowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej (opiekun: dr hab. Florence Bareyre)

2014 Centre for Drug Research, Uniwersytet **Helsinki, Finlandia**, tygodniowy staż w ramach projektu „Zarządzanie własnością intelektualną - klucz do sukcesu w relacjach nauki z biznesem” (opiekun: dr Paul Bromann)

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

2013 **TOP 500 Innovators Science-Management-Commercialization**, dwumiesięczny program stażowo-szkoleniowy finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Center for Executive Education, Uniwersytet Kalifornijski, **Berkeley, USA**

2011 Uniwersytet Ludwika i Maksimiliana, **Monachium, Niemcy**, miesięczny międzynarodowy staż dla kadry dydaktycznej organizowany w ramach projektu *“Pro bono Collegii Medici Universitatis Jagiellonicae”*

2007 Uniwersytet Maltański, **Msida, Malta**, pięciomiesięczny staż w ramach stypendium Socrates/Erasmus

5. 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.)

5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Opracowanie innowacyjnych związków w grupie *N-(E)*-cynamoilo i *N-(E)*-cynamilo pochodnych aminoalkanoli wykazujących aktywność farmakologiczną w układzie nerwowym

5.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

H1 Gunia-Krzyżak A(*), Waszkielewicz AM, Słoczyńska K, Borczuch-Kostańska M, Cegła M, Satała G, Bojarski AJ, Marona H. **Synthesis and anticonvulsant activity of *N*-(trans)- 3-phenylprop-2-en-1-yl (cinnamyl) derivatives of aminoalkanols.** *Letters in Drug Design & Discovery*, 2014, 11(8):1040-1052.

IF₂₀₁₄: 0,770; MNiSW: 15

H2 Gunia-Krzyżak A(*), Pytka K, Słoczyńska K, Waszkielewicz AM, Satała G, Bojarski AJ, Sapa J, Filipek B, Cegła M, Pękala E, Marona H. **Preliminary evaluation of central nervous system activity of (E)-*N*-2-methyl-3-phenylprop-2-enyl ((E)- α -methylcinnamyl) derivatives of selected aminoalkanols.** *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2016, 73(2):345-357.

IF₂₀₁₆: 0,745; MNiSW: 15

H3 Gunia-Krzyżak A(*), Pańczyk K, Waszkielewicz AM, Marona H. **Cinnamamide derivatives for central and peripheral nervous system disorders – a review of structure-activity relationships.** *ChemMedChem*, 2015, 10(8):1302-1325.

IF₂₀₁₅: 2,980; MNiSW: 30

H4 Gunia-Krzyżak A(*), Żelaszczyk D, Rapacz A, Żesławska E, Waszkielewicz AM, Pańczyk K, Słoczyńska K, Pękala E, Nitek W, Filipek B, Marona H. **Structure-anticonvulsant activity studies in the group of (E)-*N*-cinnamoyl aminoalkanols derivatives monosubstituted in phenyl ring with 4-Cl, 4-CH₃ or 2-CH₃.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017, 25(2):471-482.

IF₂₀₁₇: 2,881; MNiSW: 25

H5 Gunia-Krzyżak A(*), Bareyre FM, Marona H, Waszkielewicz AM. **Four N-(E)-cinnamoyl (cinnamamide) derivatives of aminoalkanols with promising anticonvulsant and analgesic activity.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2019, DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.04.006

IF₂₀₁₇: 2,442; MNiSW: 25

H6 Gunia-Krzyżak A(*), Żeślawska E, Bareyre FM, Nitek W, Waszkielewicz AM, Marona H. **Physicochemical and biological evaluation of a cinnamamide derivative R,S-(2E)-1-(3-hydroxypiperidin-1-yl)-3-phenylprop-2-en-1-one (KM-608) for nervous system disorders.** *Chemical Biology & Drug Design*, 2017, 90(2):244-252.

IF₂₀₁₇: 2,328; MNiSW: 25

H7 Żeślawska E(*), Nitek W, Marona H, **Gunia-Krzyżak A.** **Cinnamamide pharmacophore for anticonvulsant activity: evidence from crystallographic studies.** *Acta Crystallographica Section C*, 2018, C74(Pt7):782-788.

IF₂₀₁₇: 8,678; MNiSW: 15

(*) autor korespondencyjny

Sumaryczny współczynnik oddziaływania *impact factor* (IF) publikacji stanowiących podstawę habilitacji wynosi **20,824**, wg. Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW): **150** punktów.

W publikacjach **H1-H6** jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem, w publikacji **H7** jestem ostatnim autorem. Mój średni procentowy udział w prezentowanych publikacjach wynosi **71,43%**.

Wszystkie badania syntetyczne i fizykochemiczne opisane w pracach **H1, H2, H4-H7** zostały wykonane w macierzystej jednostce tj. Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum UJ CM) w Krakowie. Badania finansowano z następujących źródeł:

- o Projekt pt.: „Badania aktywności biologicznej w modelach *in vitro* i *in silico* syntetycznych związków organicznych z grupy pochodnych chiralnych i achiralnych aminoalkanoli” nr: K/DSC/004292, czas trwania: 2017, finansowany przez UJ CM ze środków MNiSW w ramach dotacji celowej na rozwój młodych naukowców. Kierownik: dr Agnieszka Gunia-Krzyżak.
- o Projekt pt.: „Synteza i badania fizykochemiczne w grupie pochodnych aminoalkanoli i aminokwasów o spodziewanej aktywności biologicznej” nr: K/DSC/001954, czas trwania: 2014-

2016, finansowany przez UJ CM ze środków MNiSW w ramach dotacji celowej na rozwój młodych naukowców. Kierownik: dr Agnieszka Gunia-Krzyżak.

- Projekt pt.: „**Poszukiwanie związków aktywnych w ośrodkowym układzie nerwowym**”, nr: 2013/11/B/NZ7/04834, czas trwania: 2014-2017, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu „Opus”. Kierownik: dr hab. Anna Waszkielewicz.
- Projekt pt.: „**Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej**”, nr: POIG.01.01.02-12-012/09-00, czas trwania: 2010-2014, finansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. Kierownik: prof. dr hab. Henryk Marona.
- Projekt pt.: „**Badania syntetyczne, fizykochemiczne, farmakologiczne oraz wstępna ocena bezpieczeństwa w grupie pochodnych aminoalkanoli**”, nr: K/ZDS/003328, czas trwania: 2015-2017, finansowany przez UJ CM ze środków MNiSW w ramach dotacji statutowej. Kierownik: prof. dr hab. Henryk Marona.
- Projekt pt.: „**Badania syntetyczne, fizykochemiczne oraz mikrobiologiczno-farmakologiczne w grupie pochodnych arenów**”, nr: K/ZDS/005487, czas trwania: 2012-2014, finansowany przez UJ CM ze środków MNiSW w ramach dotacji statutowej. Kierownik: prof. dr hab. Henryk Marona.

Pozostałe badania będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego zostały wykonane we współpracy z ośrodkami naukowo-badawczymi w kraju i za granicą:

- Badania farmakologiczne *in vivo* (myszy, szczury) dla wybranych związków w pracach **H1, H2, H4-H7** w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej, przeciwbólowej oraz neurotoksyczności ostrej wykonano w ramach programu poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych - *Anticonvulsant Screening Program (ASP)* w **amerykańskim Narodowym Instytucie Zdrowia (NIH, National Institutes of Health, Rockville, Bethesda, MD, USA)**. Koordynatorem współpracy ze strony Wydziału Farmaceutycznego UJ CM jest Pani prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz, a ze strony NIH - prof. James Stables i prof. Tracy Chen.
- Badania farmakologiczne *in vivo* (myszy) związku **VIIIa** w pracy **H2** obejmujące testy behawioralne (finansowane z projektu K/DSC/001955), a także badania farmakologiczne *in vivo* (myszy) związków **7, 8 i 18** w pracy **H4** w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej (finansowane z projektu „Opus” nr 2013/11/B/NZ7/04834) wykonano w **Zakładzie Farmakodynamiki Katedry Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego UJ CM** w Krakowie. Kierownik Katedry: prof. dr hab. Barbara Filipek.

- Badania aktywności w modelu traumatycznego uszkodzenia mózgu przedstawione w publikacjach **H5** i **H6** wykonała **habilitantka** podczas stażu w **Zakładzie Neurobiologii Doświadczalnej Uniwersytetu Ludwika i Maksimiliana w Monachium**. Badania te były finansowane przez:
 - Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, SFB 870), Munich Center for Neurosciences (MCN), the Wings for Life Foundation, Munich Center for Systems Neurology (DFG, SyNergy; EXC 1010)
 - Fundację na Rzecz Nauki Polskiej w ramach Programu Skills-Staże.
- Badania *in vitro* dla wybranych związków obejmujące ocenę stabilności metabolicznej z wykorzystaniem wątrobowych mikrosomów mysich lub szczurzych oraz ocenę bezpieczeństwa w modelu komórkowym i teście Ames, opisane w pracach **H2** i/lub **H4** przeprowadzono w **Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie** (kierownik Zakładu: prof. dr hab. Elżbieta Pękala).
- Badania krystalograficzne opisane w pracach **H4**, **H6** i **H7** wykonano w **Instytucie Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie** i w **Zakładzie Krystalochemii i Krystalofizyki Wydziału Chemii UJ w Krakowie**.
- Badania *in vitro* prezentowane publikacjach **H1** i **H2** w kierunku powinowactwa do receptorów serotoninowych wykonano w **Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie** (kierownik Zakładu: prof. dr hab. Andrzej Bojarski), a wyniki prezentowane w publikacjach **H4** i **H6** w kierunku powinowactwa do celów molekularnych otrzymano komercyjnie w laboratoriach **Cerep (Francja)**.

5.3. Prezentacja wyników stanowiących podstawę habilitacji

5.3.1. Wprowadzenie

Choroby neurologiczne obejmujące różne dysfunkcje mózgu, rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych stanowią istotne zagadnienie w zakresie zdrowia publicznego na całym świecie. Znanych jest kilkaset jednostek chorobowych układu nerwowego o różnej etiologii, patofizjologii i objawach klinicznych. Zalicza się do nich m.in. demencję, chorobę Alzheimera, padaczkę, ból neuropatyczny, chorobę Parkinsona, stwardnienie rozsiane, choroby infekcyjne, udary, czy też zaburzenia psychiczne. Pacjenci z chorobami neurologicznymi często wymagają znacznego wsparcia społecznego i ekonomicznego

ze względu na ograniczenia fizyczne, poznawcze i psychospołeczne. Wspólną cechą wszystkich schorzeń neurologicznych jest brak wystarczającej wiedzy na temat patomechanizmów, rokowań czy też skutecznej terapii. Szczególny niepokój budzi wzrastająca zachorowalność związana m.in. z czynnikami środowiskowymi i współczesnym stylem życia. Liczne grupy badawcze na całym świecie pracują nad zrozumieniem patomechanizmów leżących u podstaw chorób neurologicznych, a także nad poszukiwaniem nowych skutecznych opcji terapeutycznych [1,2].

Z uwagi na to, że omawiane *N-(E)*-cynamoilo i *N-(E)*-cynamylo pochodne aminoalkanoli były testowane w kierunku wykazywania aktywności w układzie nerwowym w tym ich działania przeciwdrgawkowego, działania hamującego wtórne zmiany w przebiegu urazowego uszkodzenia mózgu i/lub aktywności przeciwbólowej w bólu neuropatycznym poniżej przedstawiono krótką charakterystykę tych schorzeń neurologicznych.

5.3.1.1. Charakterystyka padaczki

Padaczkę charakteryzują powtarzające się napady padaczkowe, wynikające z nieprawidłowego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Na poziomie komórkowym obserwowana jest nadmierna pobudliwość neuronów i zaburzenie równowagi pomiędzy przewodnictwem pobudzającego i hamującym [3]. Padaczka jest jedną z najczęstszych chorób neurologicznych, której chorobowość w zależności od wybranych do obliczeń populacji wynosi 0,2-4,1%, co przekłada się to na wysoką liczbę chorych wynoszącą na świecie około 50 milionów [4,5]. W Polsce liczba chorych szacowana jest na 400 000 [6]. Chorzy na padaczkę poza bezpośrednimi skutkami choroby w postaci napadów padaczkowych doświadczają znacznego obniżenia jakości życia. Jest to związane z występowaniem trudności w wykonywaniu codziennych czynności, a także brakiem niezależności i samodzielności, czy też utrudnionymi kontaktami społecznymi i poczuciem wykluczenia [7,8]. Z faktem tym wiążą się również doniesienia, że najczęstszą chorobą neurologiczną towarzyszącą padaczce jest depresja. Jednoczesne występowanie tych dwóch schorzeń ma związek ze wspomnianymi wyżej czynnikami psychospołecznymi, ale odkryto także wspólne mechanizmy neurobiologiczne [9]. Grupami pacjentów z padaczką, u których występują specyficzne problemy związane m.in. z odmienną farmakokinetyką ksenobiotyków, utrudnioną współpracą z lekarzem, czy szczególną podatnością na działania niepożądane stosowanych leków są dzieci, osoby starsze i kobiety w ciąży [10-12]. Innym

istotnym aspektem farmakoterapii padaczki jest wysoka lekooporność występujących drgawek. Szacuje się, że padaczka jest nieskutecznie leczona u około 30% pacjentów, pomimo dostępności na rynku kilkudziesięciu leków. Jeden z rodzajów napadów, tzw. drgawki ogniskowe charakteryzują się jeszcze wyższą opornością na leczenie wynoszącą 40% [13]. Stosowanie dostępnych leków przeciwpadaczkowych wiąże się poważnymi i częstymi działaniami niepożądanymi obejmującymi m.in. sedację, upośledzenie widzenia, hepatotoksyczność, uszkodzenie szpiku, czy też zaburzenia funkcjonowania układu pokarmowego [14]. Powyższe fakty stanowią przesłanki do poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwdrgawkowej i przeciwpadaczkowej, szczególnie takich, które eliminowałyby dolegliwości obecnie klasyfikowane jako lekooporne.

Najpowszechniejszą formą leczenia padaczki stosowaną u co najmniej 95% pacjentów jest farmakoterapia. Głównym celem podejmowanej farmakoterapii jest całkowite wyeliminowanie napadów padaczkowych, co w konsekwencji ma prowadzić do odczuwanej przez pacjenta poprawy jakości życia oraz zapobiegania ponapadowym skutkom w postaci organicznego uszkodzenia mózgu [8,15]. Stosowane obecnie leki przeciwpadaczkowe charakteryzują się zróżnicowaną budową chemiczną i mechanizmem działania. Miejsce w terapii padaczki znalazły m.in. kwasy (kwas walproinowy, tiagabina, gabapentyna), pochodne dibenzoazepiny (karbamazepina, oksykabazepina, octan eslikabazepiny), pochodne hydantoiny (fenytoina), pochodne pyrolidyno-2,5-dionu (etosuksymid), pochodne triazyny (lamotrygina), pochodne amidowe (lakoamid), pochodne aminowe (pregabalina), a także inne związki chemiczne [16]. Również komórkowy mechanizm działania leków przeciwpadaczkowych jest bardzo zróżnicowany i obejmuje m.in. modulowanie aktywności napięciowo-zależnych kanałów jonowych (sodowych, potasowych, wapniowych), hamowanie receptorów aminokwasów pobudzających (NMDA, AMPA), czy też wpływ na przekaźnictwo GABAergiczne w zakresie pobudzania receptorów GABA_A, hamowania transaminazy GABA lub blokowania transportera GABA. Jednocześnie uważa się, że ze względu na heterogeniczną manifestację kliniczną napadów padaczkowych korzystne jest wykazywanie wielu mechanizmów działania przez lek przeciwpadaczkowy [17].

5.3.1.2. Charakterystyka urazowego uszkodzenia mózgu

Urazowe uszkodzenie mózgu (ang. *traumatic brain injury*) stanowi znaczący problem medyczny, dla którego zapadalność w zależności od rejonu świata szacuje się na 150-235 pacjentów hospitalizowanych na 100 000 ludności. Obejmuje ono szeroki zakres skutków,

obrażeń lub urazów mózgu spowodowanych działaniem siły zewnętrznej. Zalicza się go do głównych przyczyn śmiertelności wśród młodych dorosłych, którzy częściej uczestniczą np. w wypadkach komunikacyjnych. Drugą szczególnie narażoną grupą są osoby starsze, które ulegają wypadkom na skutek zaburzonej sprawności psychofizycznej. Do objawów natychmiastowych urazowego uszkodzenia mózgu zalicza się uszkodzenie mechaniczne, dezorientację, splątanie, ból głowy, nudności i wymioty, senność, utratę pamięci, utratę przytomności i inne ubytkowe objawy neurologiczne. Ponadto uważa się, że u wszystkich poszkodowanych, u których doszło do umiarkowanego lub ciężkiego urazu utrzymują się długotrwałe następstwa neurobehawioralne takie jak zaburzenia funkcji poznawczych, zmiany w zakresie osobowości, czy też zaburzenia psychiczne. Możliwe jest także wystąpienie drgawek [18,19].

Charakterystyczny obraz patofizjologii urazowego uszkodzenia mózgu obejmuje dwie fazy: pierwotną i wtórną. W pierwotnej, obserwowanej podczas samego urazu, następuje mechaniczne uszkodzenie tkanki mózgowej i naczyń krwionośnych. Uszkodzenie wtórne jest konsekwencją pierwotnego i występuje opóźnione w czasie. Jego patomechanizm jest złożony i jeszcze nie do końca wyjaśniony. Obejmuje ono szereg zmian na poziomie molekularnym, komórkowym i biochemicznym skutkujących epizodami niedotleniowo-niedokrwinnymi, obrzękiem mózgu, zaburzeniami metabolicznymi, zmianami w przepuszczalności naczyń, uszkodzeniem aksonów, rozwojem stanu zapalnego, rozwojem infekcji, czy też skurczem naczyń. Celem terapii urazowego uszkodzenia mózgu jest hamowanie zmian pierwotnych i zapobieganie zmianom wtórnym. Zastosowana farmakoterapia powinna wykazywać przede wszystkim działanie neuroprotektyjne, aby w jak największym stopniu zapobiegać wtórnym procesom uszkodzenia komórek nerwowych i ich otoczenia i w ten sposób ograniczać późniejsze powikłania w postaci zaburzeń neurobehawioralnych. Jako miejsca uchwytu dla terapii wtórnego uszkodzenia mózgu wymienia się apoptozę, aminokwasowe neuroprzekaźniki pobudzające, stan zapalny, produkcję wolnych rodników, czy też zaburzenia poziomu jonów Ca^{2+} . Ogólnie zaleca się, aby farmakoterapia obejmowała skojarzone stosowanie leków o zróżnicowanym mechanizmie działania [20-22].

Wśród rozważanych opcji terapeutycznych urazowego uszkodzenia mózgu ważne miejsce zajmują leki przeciwpadaczkowe, które wykazały różne korzystne efekty zarówno w eksperymentalnych modelach zwierzęcych jak i badaniach klinicznych. Najwięcej doniesień dotyczy kwasu walproinowego, który zyskał miano nowej opcji terapeutycznej

w leczeniu ostrych uszkodzeń centralnego układu nerwowego, takich jak urazowe uszkodzenie mózgu, udar mózgu, czy też uszkodzenie rdzenia kręgowego [23]. W modelach urazowego uszkodzenia mózgu u myszy i szczurów udowodniono dla niego korzystne efekty w zakresie zmniejszenia objętości rany mózgu, uszczelnienia bariery krew-mózg, ograniczenia uszkodzenia neuronów w obszarze hipokampa i/lub polepszenia koordynacji ruchowej i pamięci przestrzennej [24,25]. Ponadto w badaniach na świniach wykazano zmniejszenie obszaru uszkodzenia mózgu i zahamowanie obrzęku mózgu po leczeniu kwasem walproinowym w skojarzeniu z mrożonym osoczem krwi [26]. Zaproponowany komórkowy mechanizm działania kwasu walproinowego w leczeniu ostrych uszkodzeń centralnego systemu nerwowego obejmuje aktywność antyapoptotyczną, hamowanie deacetylaz histonowych i efekt przeciwzapalny [23]. Topiramata podawany szczurom po wywołaniu u nich urazowego uszkodzenia mózgu nie wpływał na zmiany histologiczne i obrzęk mózgu, jednak znacząco poprawiał sprawność motoryczną i zdolność uczenia u leczonych zwierząt w porównaniu z grupą kontrolną nie otrzymującą leku [27]. Fenytoina podawana profilaktycznie dorosłym pacjentom z ciężkim urazowym uszkodzeniem mózgu chroniła przed wystąpieniem drgawek wczesnych (do 7 dni od urazu), nie miała natomiast wpływu na wystąpienie drgawek późnych [28].

Znanych jest ponad 130 związków, dla których wykazano korzystne efekty w zwierzęcych modelach urazowego uszkodzenia mózgu [22]. Przykładowo, badania przeprowadzone na myszach wykazały korzystne działanie litu w dawkach 2,0 i 3,0 mEq/kg w zakresie zmniejszenia objętości rany, zmniejszenia liczby martwych neuronów w obrębie zakrętu zębatego i uszczelnienia bariery krew-mózg. Podanie litu miało także korzystne efekty na odległe w czasie czynności neurobehawioralne badanych zwierząt w zakresie aktywności przeciwłękowej (badanej w teście otwartego pola) i koordynacji ruchowej (badanej w testach rotarod i beam-walk) [29,30]. Efekty neuroprotektoryjne w zwierzęcych modelach urazowego uszkodzenia mózgu udowodniono również m.in. dla kortykosteroidów, progesteronu, cyklosporyny A, statyn, erytropoetyny, 2-metoksyestradiolu, maślanu sodu [21,22,31,32].

5.3.1.3. Charakterystyka bólu neuropatycznego

Ból neuropatyczny to według definicji zaakceptowanej przez Międzynarodowe Towarzystwo Badania i Leczenia Bólu „ból spowodowany uszkodzeniem lub chorobą somatosensorycznej części układu nerwowego”. W przeciwieństwie do bólu receptorowego,

będącego naturalną reakcją obronną organizmu na bodźce zewnętrzne, przyczynę bólu neuropatycznego stanowi dysfunkcja bądź uszkodzenie obwodowych lub ośrodkowych włókien nerwowych. W opinii ekspertów jest on trudny do zdiagnozowania i leczenia [33].

Obecnie światowe zalecenia terapii syndromów bólu neuropatycznego uwzględniają następujące leki pierwszego rzutu:

- leki przeciwdepresyjne w tym trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (amitryptylina, imipramina) i selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny i noradrenaliny (wenlafaksyna, duloksetyna);
- leki przeciwpadaczkowe (gabapentyna, pregabalina);
- leki miejscowo znieczulające (lidokaina stosowana w plastrach) [33].

Jako leki drugiego rzutu stosowane są opioidy i tramadol. Gdy chory nie odczuwa poprawy po zastosowaniu wymienionych klas leków wprowadza się leki trzeciego rzutu takie jak inne leki przeciwdepresyjne (bupropion, citalopram, paroksetynę), inne leki przeciwpadaczkowe (karbamazepina, lamotrygina, okskarbazepina, topiramata, kwas walproinowy), kapsaicynę, dekskrometorfan, memantynę, meksyletynę [34,35]. Szacuje się, że obecnie stosowane leki są skuteczne jedynie u 50% pacjentów i powodują zmniejszenie odczuwania bólu jedynie o 30-50%. Dużym wyzwaniem farmakoterapii bólu neuropatycznego jest brak dedykowanego leku w tym schorzeniu [35].

Wiadomo, że wśród mechanizmów działania predysponujących do aktywności w bólu neuropatycznym są: modulowanie napięciowo-zależnych kanałów jonowych (sodowych, potasowych, wapniowych), wpływ na układ GABAergiczny, modulowanie receptorów opioidowych, kanabinoidowych i kwasu glutaminowego, wpływ na aktywność monoamin takich jak noradrenalina, acetylocholina, serotonina, podrodzina receptora waniloidowego przejściowego potencjału (TRPV1) [36].

5.3.1.4. Poszukiwanie nowych leków w padaczce, urazowym uszkodzeniu mózgu i bólu neuropatycznym

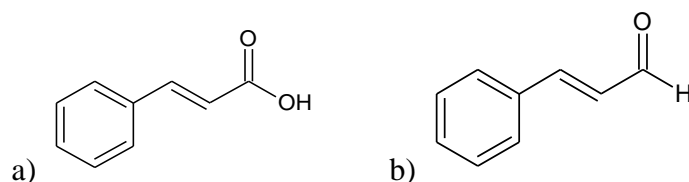
W farmakoterapii trzech opisanych wyżej schorzeń neurologicznych, padaczki, urazowego uszkodzenia mózgu i bólu neuropatycznego, korzystne jest wykazywanie działania na kilka celów molekularnych przez stosowane leki. W przypadku, gdy brakuje wiedzy na temat konkretnego celu molekularnego lub gdy nie jest on znany, w poszukiwaniu nowych kandydatów na leki szerokie zastosowanie znajdują badania

przesiewowe na zwierzętach. Poza możliwością identyfikacji określonej aktywności farmakologicznej, testy i modele *in vivo* umożliwiają wyselekcjonowanie związków posiadających odpowiednie cechy farmakodynamiczne konieczne do wystąpienia tej aktywności, w tym zdolności dotarcia do celu molekularnego, co w przypadku związków działających w obrębie układu nerwowego wiąże się z koniecznością pokonywania bariery krew-mózg [17,37].

Z perspektywy chemii farmaceutycznej brak konkretnego ściśle zdefiniowanego celu molekularnego stanowi przesłankę do podjęcia poszukiwań nowych aktywnych związków w oparciu o tzw. farmakofor. Mianem farmakoforu określa się model prezentujący przestrzenne relacje między określonymi elementami struktury, które są wspólne dla aktywnych związków, przy czym nie stanowi on ani cząsteczki, ani połączenia grup funkcyjnych. Elementami budującymi farmakofor mogą być wybrane fragmenty o pewnych właściwościach np. donory lub akceptory wiązań wodorowych, ugrupowania hydrofobowe, aromatyczne, bądź kwasowe lub zasadowe. Gdy brakuje informacji o celu molekularnym lub gdy nie jest on znany, możliwe jest zaprojektowanie farmakoforu na podstawie struktur związków aktywnych (ang. *ligand based pharmacophore*) dzięki analizie i wytypowaniu cech strukturalnych warunkujących określoną aktywność [38,39].

5.3.2. Założenia i cel pracy

Kwas cynamonowy (**Ryc. 1a**) należy do nienasyconych aromatycznych kwasów organicznych. Występuje naturalnie w roślinach, gdzie służy m.in. jako substrat do syntezy aldehydu cynamonowego (**Ryc. 1b**).



Rycina 1. Struktury chemiczne kwasu *E*-cynamonowego (a), aldehydu *E*-cynamonowego (b).

Związki te charakteryzują się prostą budową dającą możliwość wprowadzenia szeregu modyfikacji strukturalnych w celu otrzymania nowych pochodnych cechujących się

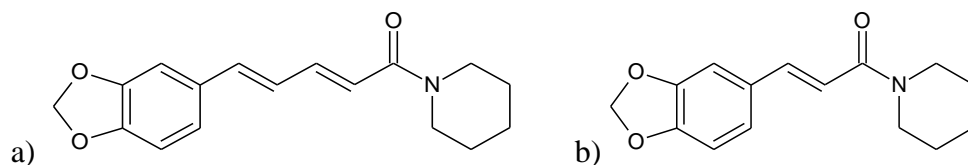
odpowiednimi właściwościami fizykochemicznymi oraz biologicznymi. Możliwe miejsca modyfikacji obejmują:

- i) pierścień fenylowy - daje możliwość wprowadzenia różnorodnych podstawników np. grup alkilowych, alkoksylowych, arylowych, hydroksylowych, fluorowców;
- ii) łącznik etylenowy - warunkuje występowanie izomerii geometrycznej (konfiguracja *E* lub *Z*), daje możliwość wprowadzenia różnorodnych podstawników;
- iii) grupy funkcyjne: karboksylowa/aldehydowa - umożliwiają otrzymanie nowych związków z innych grup chemicznych np. estrów, amidów, amin, eterów.

Właściwości biologiczne niezmodyfikowanego kwasu i aldehydu cynamonowego były przedmiotem licznych publikacji naukowych. Szeroka gama opisanych efektów obejmuje działanie przeciwdrobnoustrojowe [40,41], przeciwnowotworowe [42], czy też antyoksydacyjne [41]. Warto wspomnieć, że w przypadku niezmodyfikowanych substancji i ich prostych pochodnych takich jak kwas kawowy (kwas 4-hydroksycynamonowy) czy ferulowy (kwas 4-hydroksy-3-metoksycynamonowy), doniesienia literaturowe dotyczą wielokrotnie badań prowadzonych na ekstraktach roślinnych, w których metodami fizykochemicznymi potwierdzano obecność związków aktywnych. Odpowiednie modyfikacje chemiczne umożliwiły otrzymanie syntetycznych pochodnych cechujących się korzystniejszymi właściwościami biologiczno-farmakologicznymi. Dostępna literatura dostarcza informacji o ich działaniu przeciwnowotworowym i cytotoksycznym [42-45], przeciwdrobnoustrojowym w tym przeciwbakteryjnym [41,46], przeciwgrzybiczym [41,47,48], przeciwgruźliczym [49], przeciwmalarycznym [50,51], antyoksydacyjnym [41,52], hepatoprotekcyjnym [42], przeciwcukrzycowym [42], obniżającym poziom cholesterolu [53], hamującym proces melanogenezy [54], hamującym metaloproteinazy [55], czy też fotoprotekcyjnym [56]. Ponadto szereg publikacji dotyczy aktywności pochodnych kwasu cynamonowego w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. W licznych badaniach wykazano m.in. ich korzystną aktywność przeciwdrgawkową, przeciwbólową, neuroprotekcyjną i przeciwdepresyjną.

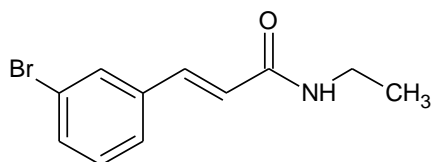
Zastosowanie pochodnych kwasu cynamonowego w leczeniu padaczki, choć nieświadome, było znane od wielu wieków w tradycyjnej medycynie azjatyckiej i afrykańskiej. Wykorzystywano w tym celu rośliny z rodziny Pieprzowatych (*Piperaceae*). Rozwój nauki pozwolił na wyizolowanie związków odpowiedzialnych za aktywność

przeciwpadaczkową tj. piperyny (*piperine*) i antyepilepsyryny (*antiepilepsirine*) (**Ryc. 2**). Antyepilepsyryna została zarejestrowana jako lek przeciwpadaczkowy w Chinach [57].



Rycina 2. Struktury chemiczne piperyny (a) i antyepilepsyryny (b).

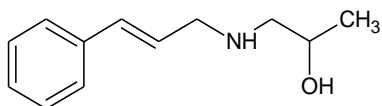
Natomiast cynromid (*cinromide*, **Ryc. 3**), syntetyczna pochodna amidu kwasu cynamonowego podstawiona w pierścieniu fenyłowym atomem bromu w pozycji *meta* i posiadająca podstawnik *N*-etyłowy była testowana w badaniach klinicznych w zespole Lennox-Gastant, jednej z postaci padaczki, która występuje u dzieci [58,59].



Rycina 3. Struktura chemiczna cynromidu.

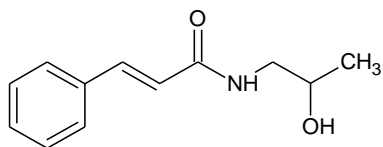
Przesłanką do prowadzenia badań w zakresie aktywności w układzie nerwowym pochodnych kwasu cynamonowego, poza doniesieniami literaturowymi, były także własne doświadczenia w tym zakresie. Otrzymane w ramach mojej pracy doktorskiej związki stanowiące pochodne *N-(E)*-cynamoilo i *N-(E)*-cynamylo wybranych aminoalkanoli, pomimo stosunkowo prostej struktury, wykazywały korzystną aktywność przeciwdrgawkową w różnych zwierzęcych modelach drgawek, porównywalną do niektórych obecnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych. Ponadto niektóre z nich, poza działaniem przeciwdrgawkowym, charakteryzowały się aktywnością przeciwbólową w bólu neuropatycznym.

Poniżej przedstawione związki **A**, **B** i **C** (**Ryc. 4**) stanowią struktury odniesienia w dalszych pracach. Parametry farmakologiczne związków **A**, **B** i **C** świadczące o ich aktywności przeciwdrgawkowej dorównują wybranym lekom przeciwpadaczkowym (**Ryc. 4**).



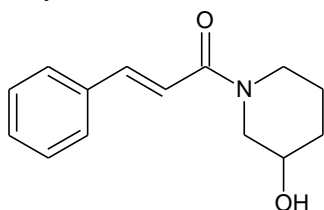
Aktywność MES, myszy, *i.p.*:
100% protekcji w dawkach 30 i 100 mg/kg

Struktura odniesienia **A**: *R,S*-1-[[*(2E)*-3-fenylprop-2-en-1-yl]amino}propan-2-ol) (pochodna *N*-cynamylowa *R,S*-1-aminopropan-2-olu)



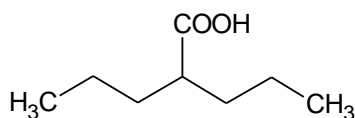
ED_{50} (MES, myszy, *i.p.*) = 47,12 mg/kg, $PI=2,9$
 ED_{50} (scPTZ, myszy, *i.p.*) = 77,10 mg/kg, $PI=1,8$
 ED_{50} (MES, szczury, *p.o.*) = 22,80 mg/kg, $PI>21,9$
 ED_{50} (scPTZ, szczury, *p.o.*) = 46,20 mg/kg, $PI>10,8$
 ED_{50} (*kindling*, hipokamp, szczury, *i.p.*) = 50,28 mg/kg

Struktura odniesienia **B**: *R,S*-(*2E*)-*N*-(2-hydroksypopylo)-3-fenylprop-2-enamid (pochodna *N*-cynamoilowa *R,S*-1-aminopropan-2-olu)



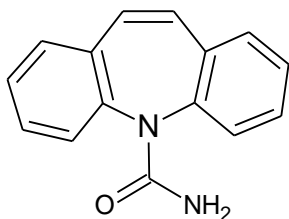
ED_{50} (MES, myszy, *i.p.*) = 54,98 mg/kg, $PI=2,5$
 ED_{50} (scPTZ, myszy, *i.p.*) = 82,28 mg/kg, $PI=1,7$
 ED_{50} (MES, szczury, *p.o.*) = 43,45 mg/kg, $PI>11,5$
 ED_{50} (scPTZ, szczury, *p.o.*) = 118,00 mg/kg, $PI>4,2$
 ED_{50} (6-Hz, 32 mA, myszy, *i.p.*) = 60,62 mg/kg, $PI=2,3$

Struktura odniesienia **C**: *R,S*-(*2E*)-1-(3-hydroksypiperydyn-1-yl)-3-fenylprop-2-en-1-on (o alternatywnym symbolu **KM-608**)



ED_{50} (MES, myszy, *i.p.*) = 263 mg/kg, $PI=1,5$
 ED_{50} (scPTZ, myszy, *i.p.*) = 220 mg/kg, $PI=1,8$
 ED_{50} (MES, szczury, *p.o.*) = 485 mg/kg, $PI=1,6$
 ED_{50} (scPTZ, szczury, *p.o.*) = 646 mg/kg, $PI=1,2$
 ED_{50} (6-Hz, 32 mA, myszy, *i.p.*) = 126 mg/kg, $PI=3,2$
 ED_{50} (*kindling*, hipokamp, szczury, *i.p.*) = 1287,5 mg/kg

Kwas walproinowy



ED_{50} (MES, myszy, *i.p.*) = 7,8 mg/kg, $PI=5,8$
 ED_{50} (scPTZ, myszy, *i.p.*) > 50 mg/kg, $PI<0,9$
 ED_{50} (MES, szczury, *p.o.*) = 5,35 mg/kg, $PI=68,0$
 ED_{50} (scPTZ, szczury, *p.o.*) > 250 mg/kg, $PI<1,5$
 ED_{50} (6-Hz, 32 mA, myszy, *i.p.*) = 60,62 mg/kg, $PI=2,3$
 ED_{50} (*kindling*, hipokamp, szczury, *i.p.*) = 119,4 mg/kg

Karbamazepina

Rycina 4. Struktury związków odniesienia **A**, **B**, **C** oraz leków przeciwpadaczkowych: kwasu walproinowego i karbamazepiny wraz z wybranymi parametrami farmakologicznymi. Dane farmakologiczne leków pochodzą z referencji [60-62].

Związek **A** stanowi pochodną *N*-cynamylową *R,S*-1-aminopropan-2-olu, który wykazał korzystne działanie po podaniu dootrzewnowym w teście maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) u myszy. Pochodne *N*-cynamoilowe *R,S*-1-aminopropan-2-olu (**B**)

i *R,S*-3-hydroksypiperydyny (**C**) wykazały szeroką aktywność przeciwdrgawkową w testach MES, drgawek indukowanych podskórną iniekcją pentylenotetrazolu (*sc*PTZ), 6-Hz i/lub modelu drgawek rozniecanych i były przedmiotem badań poszerzonych mających na celu zdefiniowanie parametrów ilościowych (ED₅₀, PI).

Dalsze prace w tej grupie pochodnych *N*-(*E*)-cynamoilo i *N*-(*E*)-cynamylo wybranych aminoalkanoli, prezentowane jako główne osiągnięcie naukowe, dotyczyły syntezy nowych pochodnych stanowiących modyfikacje aktywnych struktur (**A** i **B**) i ocenę ich aktywności przeciwdrgawkowej, a także poszerzonych badań farmakologicznych związku **C**, który należał do najaktywniejszych przeciwdrgawkowo substancji. Poszerzone badania przewidziano także dla najaktywniejszych związków wyselekcjonowanych z nowo otrzymanych serii.

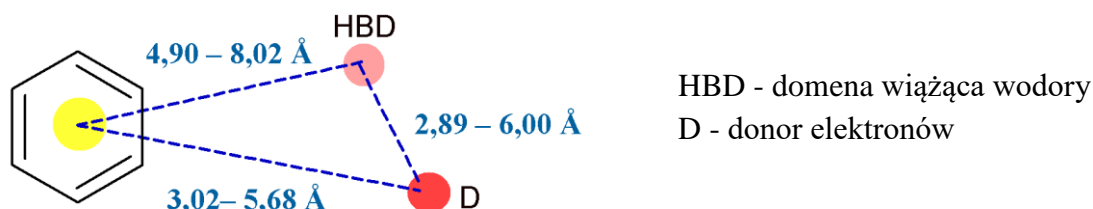
Modyfikacje strukturalne związków **A** i **B** polegały na wprowadzeniu wybranych podstawników do pierścienia fenyloвого i/lub łącznika etenylenowego. Dodatkowo, w oparciu o własne doświadczenia, z których wynika, że istotny wpływ na aktywność przeciwdrgawkową ma komponenta aminoalkanolowa, w nowych związkach modyfikowano także *N*-podstawnik w grupie amidowej.

Projektowanie przewidzianych do syntezy struktur opierało się o założenia na temat obecności określonych elementów farmakoforowych w cząsteczce i ich wpływu na wykazywanie korzystnej aktywności przeciwdrgawkowej. Związki miały zawierać takie elementy jak:

- jedna lub więcej domen hydrofobowych (np. pierścień fenyłowy);
- domena wiążąca wodory (ang. *hydrogen bonding domain*, posiada właściwości akceptora i donora wiązań wodorowych, utworzona jest przez donor elektronów występujący w odpowiednio blisko do grupy NH, np. grupa amidowa z wolnym wodorem przy azocie);
- dodatkowe elementy strukturalne o właściwościach akceptorowo-donorowych wiązań wodorowych.

Obecność takich fragmentów determinuje możliwość wystąpienia interakcji z celem molekularnym np. dzięki wiązaniom wodorowym i/lub hydrofobowym. Powyższe założenie opiera się o dostępne w literaturze dane dotyczące budowy leków przeciwpadaczkowych i związków, dla których udowodniono w badaniach przedklinicznych obiecującą aktywność przeciwdrgawkową. Analiza ich struktur chemicznych przeprowadzona przez Khana i wsp.

[63] pozwoliła na zaproponowanie modelu farmakoforowego związków wykazujących aktywność w teście MES, który zakłada obecność akceptora wiązań wodorowych/donora elektronów (**D**) w odległościach 3,02-5,68 Å od pierścienia aromatycznego i 2,89-6,00 Å od domeny wiążącej wodory (**HBD**) i bardziej zróżnicowanym dystansie pomiędzy pierścieniem fenylovym a **HBD** wynoszącym 4,90-8,02 Å (**Ryc. 5**).



Rycina 5. Zaproponowany model farmakoforu dla związków wykazujących aktywność w teście MES [63].

Poszerzone badania farmakologiczne związku **C** i nowych pochodnych miały obejmować dodatkowe testy aktywności przeciwdrgawkowej w modelach drgawek rozniecanych (*kindling*) i/lub badanie aktywności przeciwbólowej. Dodatkowo z uwagi na podobną patogenezę padaczki, wtórnych zmian w przebiegu urazowego uszkodzenia mózgu oraz bólu neuropatycznego, u podstaw której leży nadreaktywność w obrębie włókien nerwowych, a także na tożsame molekularne mechanizmy aktywności substancji stosowanych w terapii tych schorzeń (m.in. wpływ na napięciowo-zależne kanały jonowe, wpływ na układ GABAergiczny i glutaminergiczny) racjonalne jest wspólne testowanie nowych kandydatów na leki w fazie przedklinicznej.

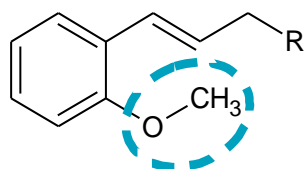
W oparciu o przedstawione powyżej założenia celem przeprowadzonych przeze mnie prac były:

- modyfikacje strukturalne związków odniesienia **A** i **B** prowadzące do otrzymania nowych pochodnych charakteryzujących się korzystniejszą aktywnością farmakologiczną i/lub odpowiednimi właściwościami fizykochemicznymi mogącymi pozytywnie wpływać na ich biodostępność;
- poszerzenie biblioteki związków w celu przeprowadzenia analizy struktura-aktywność na podstawie otrzymanych wyników badań przesiewowych w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej *in vivo*;

- przeprowadzenie resyntezy pochodnych wykazujących obiecującą aktywność przeciwdrgawkową w testach przesiewowych, aby zapewnić wystarczającą ilość związków do badań poszerzonych w testach ilościowych, obejmujących wyznaczenie parametrów farmakologicznych ED₅₀ i TD₅₀, w modelach drgawek opornych i/lub modelach epileptogenezy, a także bólu neuropatycznym;
- zbadanie aktywności wybranych najbardziej obiecujących związków w hamowaniu zmian wtórnych w przebiegu urazowego uszkodzenia mózgu;
- próby wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania aktywnych pochodnych;
- zaproponowanie modelu farmakoforowego na podstawie badań krystalograficznych dla pochodnych kwasu cynamonowego wykazujących aktywność przeciwdrgawkową.

5.3.3. Wyniki badań i dyskusja

H1 Gunia-Krzyżak A, Waszkielewicz AM, Słoczyńska K, Borczuch-Kostańska M, Cegła M, Satała G, Bojarski AJ, Marona H. **Synthesis and anticonvulsant activity of N-(trans)- 3-phenylprop-2-en-1-yl (cinnamyl) derivatives of aminoalkanols.** *Letters in Drug Design & Discovery*, 2014, 11(8):1040-1052.



R - aminoalkanol

Rycina. 6. Ogólny wzór pochodnych opisanych w publikacji **H1**.

W publikacji **H1** opisano syntezę, właściwości fizykochemiczne i aktywność przeciwdrgawkową związków **1-16** w tym związku odniesienia **A**. Związki **1-16** stanowią zwartą grupę *N*-cynamylowych pochodnych aminoalkanoli, w tym substancji niezmodyfikowanych w pierścieniu fenylowym (związki **1-11**) oraz nowych oryginalnych pochodnych, które zawierały w pierścieniu fenylowym podstawnik *ortho*-metoksyłowy (związki **12-16**). Przesłanką dla tej modyfikacji było wprowadzenie do cząsteczki dodatkowego akceptora wiązań wodorowych (grupa O-CH₃), który w porównaniu ze związkami niepodstawionymi daje możliwość tworzenia nowego miejsca oddziaływania z celem molekularnym. Komponentę aminoalkanolową w nowych związkach stanowiły *R,S*-2-aminopropan-1-ol, *R,S*-1-aminopropan-1-ol, *R,S*-2-aminobutan-1-ol, 2-amino-2-metylopropan-1-ol, *D,L-trans*-2-aminocykloheksanol (**Ryc. 6**).

Tytułowe pochodne otrzymano w dwuetapowym procesie obejmującym syntezę zasady Schiffa z aldehydu *trans*-cynamonowego lub *trans-o*-metoksycynamonowego i odpowiedniego aminoalkanolu oraz jej redukcję z wykorzystaniem borowodoru sodu. Czystość została potwierdzona za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej w trzech różnych układach rozwijających, a tożsamość m.in. w widmach ^1H NMR, które pozwoliły także na potwierdzenie konfiguracji *E* wiązania podwójnego łącznika cynamyłowego. Stała sprzężenia (*J*) sygnałów wodorów związanych z węglami podwójnego wiązania wynosiła 15,8-16,2 Hz. Dla wybranych związków wykonano pilotażowe badania wyznaczenia stałej dysocjacji (wyrażonej współczynnikiem p*K*_a) z zastosowaniem metody potencjometrycznej. Miało to na celu dokonanie pełniejszej analizy właściwości fizykochemicznych, które znacząco wpływają na farmakokinetykę związków, w tym na ich biodostępność.

Związki zostały przebadane w kierunku wykazywania aktywności przeciwdrgawkowej w ramach programu poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych (ASP) w amerykańskim Narodowym Instytucie Zdrowia (NIH). Większość pochodnych była testowana według standardowego protokołu obejmującego testy maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES), podskórnego pentylenetetrazolu (*sc*PTZ, nazwy synonimowe chemokonwulsanta to: pentetrazol, metrazol, kardiazol) i neurotoksyczności (rotarod) wykonywane na myszach po dootrzewnowym podaniu badanego związku. Testy MES i *sc*PTZ określa się mianem „złotego standardu” w poszukiwaniu nowych leków przeciwpadaczkowych. Test maksymalnego wstrząsu elektrycznego pozwala zidentyfikować substancje aktywne u ludzi w uogólnionych napadach toniczno-klonicznych, natomiast aktywność w teście *sc*PTZ może prognozować skuteczność danej substancji w napadach nieświadomości u ludzi [15,64].

Badane związki wykazały zróżnicowaną aktywność w teście MES, większość z nich była aktywna w dawce 100 mg/kg (myszy, *i.p.*), a związki **4** (pochodna *R,S*-1-aminopropan-2-olu), **12** (pochodna *R,S*-2-aminopropan-1-olu) i **16** (pochodna *trans-D,L*-2-aminocykloheksanolu) wykazały dodatkowo protekcję przed wystąpieniem drgawek w dawce 30 mg/kg (myszy, *i.p.*). Związki nie były natomiast aktywne w teście *sc*PTZ, co mogłoby sugerować określony mechanizm działania na poziomie komórkowym. Jak podają źródła literaturowe, za najskuteczniejsze w teście MES uważa się substancje hamujące napięciowo-zależne kanały sodowe, choć aktywne związki wykazują też inne mechanizmy działania jak aktywacja kanałów potasowych, działanie poprzez podjednostkę $\alpha\delta$ kanałów wapniowych, antagonizm

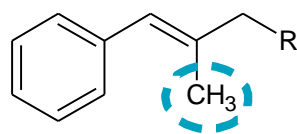
receptorów NMDA lub AMPA. Skuteczność w teście scPTZ wykazują związki blokujące kanały wapniowe oraz wpływające na układ GABAergiczny [15,64]. Badane związki wykazywały zróżnicowaną neurotoksyczność ocenianą metodą obracającego się pręta u myszy po podaniu dootrzewnowym. Działanie neurotoksyczne było obserwowane szczególnie w dawce 300 mg/kg czyli wyższej niż dawka aktywna. Większość związków w dawce 100 mg/kg była nietoksyczna lub wykazywała jedynie efekty neurotoksyczne u kilku spośród testowanych zwierząt. Ponadto 10 związków zostało przebadanych w teście MES i ocenie neurotoksyczności wykonanych na szczurach po podaniu doustnym. Nie wykazano w nich ani aktywności przeciwdrgawkowej ani neurotoksyczności. Jednak biorąc pod uwagę korzystne wyniki testu MES wykonanego u myszy po podaniu dootrzewnowym, brak aktywności po podaniu doustnym u szczurów mógł wynikać z małej biodostępności spowodowanej na przykład nieefektywnym wchłanianiem z przewodu pokarmowego.

Związek **13** (pochodna *R,S*-1-aminopropan-2-olu zawierająca podstawnik *ortho*-metoksylowy w pierścieniu fenylovym) został zakwalifikowany do zmodyfikowanego protokołu badawczego programu poszukiwania leków przeciwpadaczkowych w NIH i w pierwszej kolejności był badany w teście drgawek indukowanych prądem o niskiej częstotliwości 6-Hz (w wariancie 32 mA) na myszach po podaniu dootrzewnowym. Test 6-Hz jest uważany za model drgawek lekoopornych, a wykazana w nim skuteczność uważana jest za prognozę aktywności w drgawkach psychomotorycznych i ogniskowych u ludzi. Związek **13** w dawce 100 mg/kg chronił 50% (2 z 4) zwierząt przed wystąpieniem drgawek.

W celu znalezienia możliwego komórkowego mechanizmu działania, dla większości związków oceniono powinowactwo do receptorów serotoninerгіcznych 5-HT_{1A}, 5-HT₆ i 5-HT₇. Otrzymane wyniki wskazują na słabe wiązanie z tymi receptorami, a zatem nie jest to główny mechanizm działania badanych związków.

Pochodne *N-(E)*-cynamylaminoalkanoli, w tym posiadające grupę *o*-metoksylową w pierścieniu fenylovym, nie zostały zakwalifikowane do bardziej zaawansowanych poszerzonych badań farmakologicznych. Otrzymane wyniki aktywności przeciwdrgawkowej w teście MES (myszy, *i.p.*) świadczą jednak, że związki te stanowią interesującą grupę, w której można przeprowadzić dalsze modyfikacje strukturalne w celu optymalizacji aktywności farmakologicznej i biodostępności.

H2 Gunia-Krzyżak A, Pytka K, Słoczyńska K, Waszkielewicz AM, Satała G, Bojarski AJ, Sapa J, Filipek B, Cegła M, Pękała E, Marona H. **Preliminary evaluation of central nervous system activity of (E)-N-2-methyl-3-phenylprop-2-enyl ((E)- α -methylcinnamyl) derivatives of selected aminoalkanols.** *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2016, 73(2):345-357.



R-aminoalkanol

Rycina 7. Ogólny wzór pochodnych opisanych w publikacji **H2**.

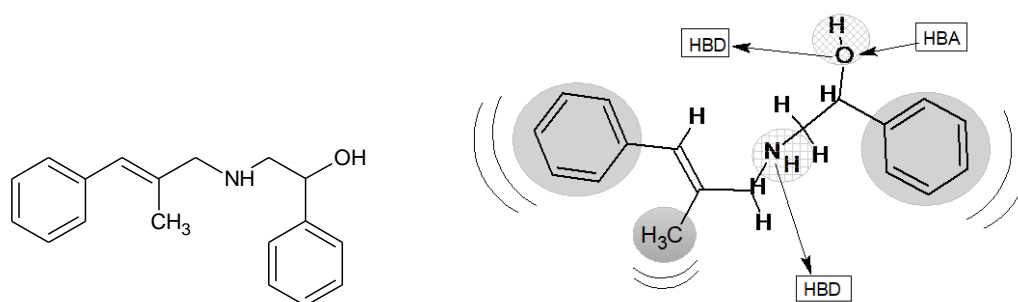
Kolejną serię otrzymanych związków stanowiło **10** *N*- α -metylocynamylowych pochodnych aminoalkanoli (**Ryc. 7**), których synteza i właściwości farmakologiczne są przedmiotem publikacji **H2**. Komponentę aminoalkanolową w tytułowych związkach stanowią *R,S*-2-aminopropan-1-ol (**I**), *R,S*-1-aminopropan-1-ol (**II**), 3-aminopropan-1-ol (**III**), *R,S*-2-aminobutan-1-ol (**IV**), 2-amino-2-metylopropan-1-ol (**V**), 4-aminobutan-1-ol (**VI**), 5-aminopentan-1-ol (**VII**), *R,S*-2-amino-1-fenyletanol (**VIII**), *D,L-trans*-2-aminocykloheksanol (**IX**) i *trans*-4-aminocykloheksanol (**X**). Badane związki zawierają w swojej strukturze co najmniej cztery elementy farmakoforowe, w tym dwie domeny hydrofobowe i dwa fragmenty o właściwościach akceptorowo-donorowych wiązań wodorowych. Jedną z domen hydrofobowych stanowi grupa metylowa wprowadzona do łańcucha cynamylowego jako modyfikacja strukturalna związku odniesienia **A** (przedstawionego na **Ryc. 4**, str. 18).

Związki **I-X** otrzymano w dwuetapowej reakcji obejmującej syntezę zasady Schiffa z aldehydu *E*- α -metylocynamonowego i odpowiedniego aminoalkanolu oraz jej redukcję z wykorzystaniem borowodoru sodu. Zasady krystalizowano z *n*-heksanu. W przypadku trudności z otrzymaniem zasady w postaci stałej z powodu zbyt niskiej temperatury topnienia, otrzymywano odpowiednie chlorowodorki. Czystość została potwierdzona za pomocą chromatografii cienkowarstwowej w trzech różnych układach rozwijających, a tożsamość m.in. w widmach ^1H NMR.

Badania aktywności przeciwdrgawkowej zostały wykonane w NIH (USA). Związki **I-V** i **VII-X** zostały przebadane według standardowego protokołu obejmującego testy MES, scPTZ i rotarod u myszy po podaniu dootrzewnowym związku w dawkach 30, 100 i 300 mg/kg. Związek **VI** został przebadany według zmodyfikowanego protokołu w testach

6-Hz i rotarod (myszy, *i.p.*). W teście MES przeprowadzonym po 0,5 godziny od dootrzewnowego podania związków, 8 z 9 testowanych substancji wykazało aktywność w dawce 100 mg/kg, a związek **I** z komponentą *R,S*-2-aminopropan-1-olu był aktywny także w dawce 30 mg/kg. Test MES wykonany po 4 godzinach od podania związków nie wykazał ich aktywności przeciwdrgawkowej, co świadczy o ich krótkim czasie działania. W teście 6-Hz (32 mA) związek **I** wykazał obiecującą aktywność w dawce 100 mg/kg po 15 minutach i 0,5 godziny od podania. Badane związki cechowały się zróżnicowaną neurotoksycznością, obserwowaną głównie w dawce 300 mg/kg. Podobnie jak w przypadku pochodnych *trans*-cynamylowych i *trans-o*-metoksycynamylowych opisanych w publikacji **H1**, także przedstawione tutaj pochodne *E*- α -metylocynamonowe nie wykazały aktywności przeciwdrgawkowej w teście *scPTZ*. Nie były także aktywne w teście MES ani neurotoksyczne po podaniu doustnym u szczurów.

W celu poszukiwania molekularnego mechanizmu działania oceniono powinowactwo badanych substancji do receptorów serotoninergetycznych 5-HT_{1A}, 5-HT₆ i 5-HT₇. Otrzymane wyniki wskazują na słabe wiązanie z tymi receptorami, jednak dla związku **VIII** otrzymano wartość K_i dla receptorów 5-HT_{1A} ~11-44 razy mniejszą w porównaniu z pozostałymi pochodnymi. Związek **VIII** różni się swoją budową od pozostałych w serii, gdyż w podstawniku przy azocie grupy aminowej posiada dodatkową komponentę hydrofobową tworzoną przez pierścień fenylowy (**Ryc. 8**).

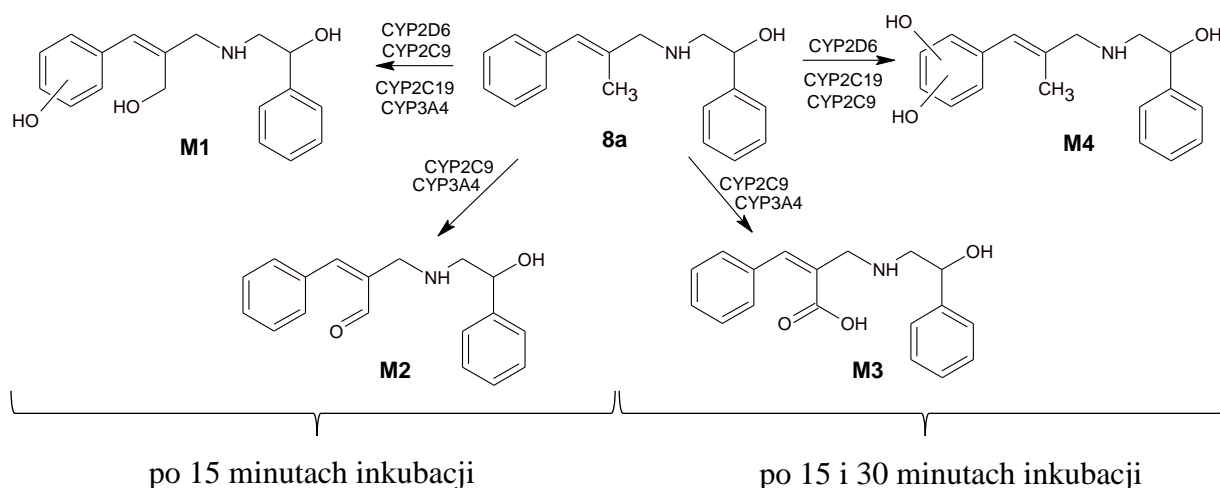


Rycina 8. Struktura związku **VIII** oraz jego elementy farmakoforowe: szare koła - domeny hydrofobowe, HBA - akceptory wiązań wodorowych, HBD - donory wiązań wodorowych

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki powinowactwa i wyróżniającą się strukturę związku **VIII**, zaplanowano dla niego dodatkowe badania w kierunku aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwlękowej. W celu optymalizacji podania związku **VIII** zwierzętom, został on przekształcony w chlorowodorek uzyskując pochodną **VIIIa**, którą poddano testom

wymuszonego pływania, czterech płytek i spontanicznej aktywności motorycznej na myszach po podaniu dootrzewnowym (badania zostały wykonane w Zakładzie Farmakodynamiki Katedry Farmakodynamiki UJ CM). Otrzymane wyniki wskazują na obiecującą aktywność przeciwdepresyjną i przeciwłękową pochodnej **VIIIa** w dawkach 20 i 30 mg/kg (test wymuszonego pływania) oraz 2,5-30 mg/kg (test czterech płytek). Były to dawki nie powodujące efektów neurotoksycznych.

Obiecujące wyniki aktywności przeciwdepresyjnej i przeciwłękowej związku **VIIIa** były przesłanką do przeprowadzenia jego szerszej charakterystyki biologicznej. Wykonano dla niego badania przewidywania metabolizmu *in vitro* z wykorzystaniem mysich mikrosomów wątrobowych (badania przeprowadzono w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej UJ CM). Wykazały one po 15 minutach inkubacji powstanie dwóch metabolitów w wyniku alifatycznej (w grupie -CH₃) i aromatycznej (w pierścieniu fenylowym) hydroksylacji, a także utleniania powstałej alifatycznej grupy hydroksylowej do aldehydowej. Z kolei po 30 minutach inkubacji w wyniku utleniania grupy aldehydowej powstawała pochodna kwasu karboksylowego oraz zachodziła kolejna hydroksylacja w pierścieniu fenylowym. Dodatkowo korzystając z programu komputerowego MetaSite (wersja 5.0.3, Molecular Discovery Ltd.) pozwalającego na przewidywanie metabolizmu ksenobiotyków, zaproponowano izoenzymy cytochromu P450 mogące brać udział w opisanych przemianach metabolicznych (**Ryc. 9**).



Rycina 9. Przemiany metaboliczne związku **VIIIa** badane *in vitro* z wykorzystaniem mysich mikrosomów wątrobowych.

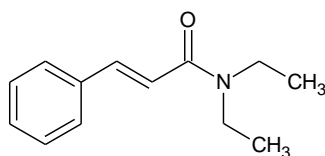
Podsumowując, opisane *N-(E)-α*-metylocynamylo pochodne aminoalkanoli wykazały aktywność w teście MES u myszy po podaniu dootrzewnowym w dawkach 30-100 mg/kg, nie były aktywne w teście scPTZ i cechowały się zróżnicowaną neurotoksycznością (głównie w dawce 300 mg/kg). Związek **VIIIa** posiada właściwości przeciwdepresyjne i przeciwlękowe (po podaniu dootrzewnowym). Z uwagi na prawdopodobieństwo słabego wchłaniania z przewodu pokarmowego opisanych związków konieczne były ich dalsze modyfikacje strukturalne w celu poprawy parametrów farmakokinetycznych.

H3 Gunia-Krzyżak A, Pańczyk K, Waszkielewicz AM, Marona H. Cinnamamide derivatives for central and peripheral nervous system disorders – a review of structure-activity relationships. ChemMedChem, 2015, 10(8):1302-1325.

Badania w grupach *N*-cynamylowych pochodnych aminoalkanoli podstawionych grupą metoksyłową w pozycji *orto* pierścienia fenyłowego (publikacja **H1**) oraz grupą metylową w pozycji alfa łańcucha (publikacja **H2**) nie przyniosły spodziewanych korzystnych rezultatów w zakresie aktywności przeciwdrgawkowej, dlatego dalsze prace postanowiono prowadzić w grupie ich amidowych analogów projektując nowe związki w oparciu o strukturę odniesienia **B** (Ryc. 4, str. 18). W pracy przeglądowej **H3**, wykorzystując o dane literaturowe, zebrano informacje na temat wykazywania możliwego działania farmakologicznego w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym oraz celów molekularnych licznych pochodnych amidu kwasu cynamonowego. Omówiono także zależności struktura-aktywność dla poszczególnych efektów farmakologicznych, zwracając uwagę na możliwe miejsca modyfikacji strukturalnych w układzie amidu kwasu cynamonowego tj. *i*) pierścienia fenyłowego, *ii*) linkera etenylenowego, *iii*) azotu grupy amidowej.

Badania aktywności przeciwdrgawkowej w grupie pochodnych amidu kwasu cynamonowego jest uzasadnione możliwością identyfikacji w strukturze tych związków elementów farmakoforowych przypuszczalnie decydujących o korzystnym profilu aktywności. Do tych elementów należą pierścień aromatyczny i grupa amidowa, które występują w wielu obecnie stosowanych lekach przeciwpadaczkowych. Z uwagi na fakt, że w strukturach amidowych pochodnych kwasu cynamonowego elementy te są połączone przy pomocy mostka etenylenowego, zapewnione jest ich odpowiednie stałe ułożenie przestrzenne. Ponadto, możliwość wprowadzenia odpowiedniego podstawnika do grupy amidowej skutkuje uzyskaniem kolejnego elementu strukturalnego dającego możliwość

wiązania z celem molekularnym. Analiza zależności pomiędzy strukturą i aktywnością przeciwdrgawkową pozwala wysunąć wnioski o korzystnym wpływie małych, hydrofobowych, elektronoakceptorowych podstawników w pozycji *meta* lub *para* pierścienia fenyłowego. Preferowanymi podstawnikami są chlor, brom, fluor, czy też grupa trifluorometylowa. Wprowadzenie takiego podstawnika może mieć wpływ na zwiększenie aktywności zarówno w testach drgawek wywoływanych przy użyciu prądu elektrycznego, jak również drgawek indukowanych chemicznie. Modyfikację strukturalną polegającą na wprowadzeniu atomu chloru w pozycji *para* pierścienia fenyłowego zastosowano w związkach będących przedmiotem publikacji **H4**. Kolejne wnioski dotyczą konfiguracji *E* podwójnego wiązania, która warunkuje efekt „wyciszający” układ nerwowy, w przeciwieństwie do związków posiadających konfigurację *Z*, które wykazywały efekt stymulujący w obrębie OUN. Minimalną odległość pomiędzy pierścieniem i grupą amidową stanowią dwa atomy węgla, przy czym wydłużanie łańcucha do czterech węgli nie powodowało utraty aktywności przeciwdrgawkowej (jak w opisanej wyżej pipernie, **Ryc. 2**). W przypadku podstawników w grupie amidowej, preferowane są raczej małe ugrupowania, przy czym wybrane związki *N*-monopodstawione, *N,N*-dipodstawione, a także posiadające azot włączony w pierścień wykazywały zadowalającą aktywność przeciwdrgawkową. Przykładem związku *N,N*-dipodstawionego jest *N,N*-dietylo-3-fenylopropop-2-enamid (**Ryc. 10**), który wykazał aktywność w teście MES ($ED_{50}=25,3$ mg/kg, szczury, *p.o.*) i scPTZ w dawce 225 mg/kg (szczury, *p.o.*).

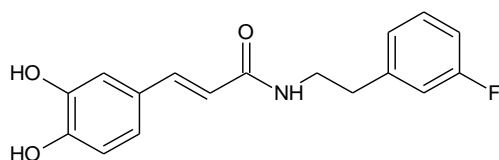


Rycina 10. Struktura (*E*)-*N,N*-dietylo-3-fenylopropop-2-enamidu.

Innymi opisanymi aktywnościami w układzie nerwowym pochodnych amidu kwasu cynamonowego są działanie przeciwdepresyjne, przeciwbólowe, przeciwzapalne, rozluźniające mięśnie szkieletowe, sedatywne, nasenne, a także wpływ na schorzenia neurodegeneracyjne i działanie neuroprotektcyjne. Możliwymi celami molekularnymi w obrębie układu nerwowego, z którymi mogą oddziaływać pochodne amidu kwasu cynamonowego są receptory kwasu γ -aminomasłowego ($GABA_A$) zlokalizowane w kanałach jonów chlorkowych, receptory kwasu *N*-metylo-(D)-asparaginowego (NMDA), receptory przejściowego potencjału (ang. *transient receptor potential*, TRP) należące do rodziny

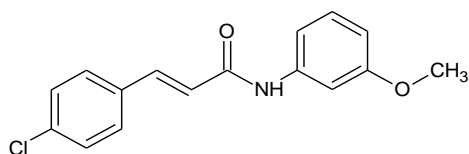
nieselektywnych kanałów kationowych, napięciowo-zależne kanały potasowe, receptory dopaminergiczne, monoaminooksydazy, deacetylazy histonowe (HDACs), receptory prostanoidowe, receptory opioidowe oraz receptory histaminowe H₃.

Interesującym przykładem związku o aktywności przeciwbólowej jest (*E*)-3-(3,4-dihydroksyfenylo)-*N*-[2-(3-fluorofenylo)etylo]prop-2-enamid (**Ryc. 11**). Posiada on bardzo lipofilowy podstawnik przy azocie grupy amidowej oraz dwie hydrofilowe grupy hydroksylowe podstawione w pierścieniu fenylowym amidu kwasu cyjamonowego. Związek ten wykazał aktywność w modelu stanu zapalnego indukowanego karagenianem w dawkach 10 i 20 mg/kg (szczury, *p.o.*), a zidentyfikowanym mechanizmem jego działania była inhibicja cyklooksygenazy 2 (COX-2) i TNF- α .



Rycina 11. Struktura (*E*)-3-(3,4-dihydroksyfenylo)-*N*-[2-(3-fluorofenylo)etylo]prop-2-enamidu.

Z kolei (*E*)-3-(4-chlorofenylo)-*N*-(3-metoksyfenylo)prop-2-enamid (**Ryc. 12**) był pierwszym zidentyfikowanym inhibitorem podrodziny receptora waniloidowego przejściowego potencjału (TRPV1). Receptor ten został niedawno zakwalifikowany jako cel molekularny w wielu schorzeniach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, w tym w bólu neuropatycznym, padaczce, drgawkach gorączkowych, udarze czy też chorobie Parkinsona.

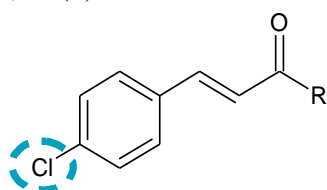


Rycina 12. Struktura (*E*)-3-(4-chlorofenylo)-*N*-(3-metoksyfenylo)prop-2-enamidu.

Dokonany przegląd literatury wskazuje, że pochodne amidu kwasu cyjamonowego stanowią interesujące i obiecujące związki, które z uwagi na możliwość określonych modyfikacji strukturalnych mogą wykazywać wielokierunkowe działanie w obrębie ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Zebrana literatura stanowiła odpowiednią przesłankę do podjęcia prac w zakresie określonych syntez (publikacja **H4**) oraz wykonania

poszerzonych badań farmakologicznych wybranych związków, w tym oceny aktywności przeciwbólowej i neuroprotekcijnej (publikacje **H5** i **H6**).

H4 Gunia-Krzyżak A, Żelaszczyk D, Rapacz A, Żesławska E, Waszkielewicz AM, Pańczyk K, Słoczyńska K, Pękala E, Nitek W, Filipek B, Marona H. **Structure-anticonvulsant activity studies in the group of (*E*)-*N*-cinnamoyl aminoalkanols derivatives monosubstituted in phenyl ring with 4-Cl, 4-CH₃ or 2-CH₃.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017, 25(2):471-482.



R-aminoalkanol

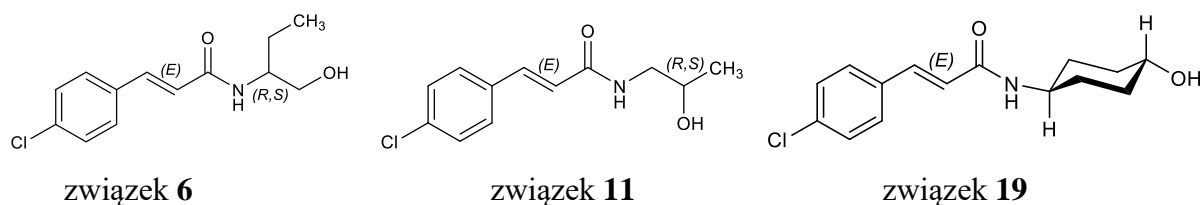
Rycina 13. Ogólny wzór pochodnych opisanych w publikacji **H4**.

Przytoczony w publikacji **H3** przegląd literatury dotyczący szerokiej aktywności farmakologicznej w układzie nerwowym pochodnych amidu kwasu cynamonowego był przesłanką do podjęcia modyfikacji strukturalnych związku odniesienia **B** (**Ryc. 4**, str. 18). Do pierścienia fenyłowego wprowadzono atom chloru w pozycję *para*, a komponentę aminoalkanolową w nowych *para*-chloro podstawionych pochodnych stanowiły: *R,S*-2-aminopropan-1-ol, *R,S*-2-aminobutan-1-ol, *R*-2-aminobutan-1-ol, *S*-2-aminobutan-1-ol, *R,S*-1-aminopropan-2-ol, *R,S*-1-aminobutan-2-ol, 2-amino-2-metylopropan-1-ol, 5-aminopentan-1-ol, *trans*-4-aminocykloheksanol. Otrzymane przeze mnie związki, po potwierdzeniu ich czystości i struktury, zostały przebadane w kierunku wykazywania aktywności przeciwdrgawkowej. Ponadto dla wyselekcjonowanych najaktywniejszych związków zostały wykonane badania mające na celu ustalenie ich komórkowego mechanizmu działania. Wyniki przeprowadzonych badań *para*-chloro *N*-cynamoilo aminoalkanolii są przedmiotem publikacji **H4** (związki **1, 2, 6-8, 11, 12, 14, 15, 17-19**) (**Ryc. 13**). Dodatkowo, ujęto w tej pracy pochodne posiadające grupę metylową w pierścieniu fenyłowym w pozycji *para* (związki **9, 12, 15, 21**) lub *orto* (**3-5, 10, 13, 16, 20, 22**), które były przedmiotem pracy doktorskiej. Pozwoliło to na poszerzenie grupy analizowanych związków i przeprowadzenie pełniejszej analizy pomiędzy strukturą a aktywnością przeciwdrgawkową.

Tytułowe *para*-chloro podstawione alkanoloamidowe pochodne kwasu cynamonowego otrzymałam w reakcji *N*-acylacji wybranego aminoalkanolu z zastosowaniem chlorku kwasu *trans*-4-chlorocynamonowego (syntezowanego uprzednio z kwasu *trans*-4-chlorocynamonowego i chlorku tionylu). Reakcję *N*-acylacji prowadziłam w środowisku dwufazowym toluen/5,5% węgiel potasu. Alternatywną i prostszą metodą syntezy była jednoetapowa reakcja kwasu *trans*-4-chlorocynamonowego z aminoalkanolem w dimetyloforamidzie w obecności *N,N'*-karbonylodiimidazolu, jednak proces ten przebiegał z dość niską wydajnością (ok. 20%). Metoda syntezy z wykorzystaniem chlorku kwasowego okazała się dużo efektywniejsza. Jej wydajność wynosiła ok.65-75%, dlatego też do otrzymywania związków do badań zdecydowano się na wykorzystanie głównie tej metody. Warto wspomnieć, że najaktywniejsze związki otrzymano w ilościach kilkugramowych (np. do badań w NIH przekazano 6,9 g związku **6**; 7,6 g związku **11** i 2,75 g związku **19**). Odpowiednia czystość otrzymanych związków wynosząca 97-100% została udowodniona przy pomocy RP-HPLC wyposażonym w detektor Corona CAD. Strukturę chemiczną związków, w tym konfigurację *E* podwójnego wiązania w łańcuchu cynamoidowym, potwierdzono w widmach ¹H NMR, ¹³C NMR oraz ESI-MS. W celu pełniejszej charakterystyki fizykochemicznej badanych enancjomerycznych pochodnych 2-aminobutan-1-olu, związku **7** o konfiguracji *R* i związku **8** o konfiguracji *S*, wykonano dla nich pomiar skręcalności właściwej, która wynosiła $[\alpha]_D^{20}=30,508^\circ \text{ cm}^3 \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ dla zw. **7** i $[\alpha]_D^{20}=-30,737^\circ \text{ cm}^3 \text{ dm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ dla zw. **8**.

Otrzymane związki zostały przebadane w ramach programu ASP w NIH oraz w Zakładzie Farmakodynamiki Katedry Farmakodynamiki UJ CM na zwierzętach (myszach i/lub szczurach) w kierunku działania przeciwdrgawkowego. Wyniki badań przesiewowych (testy MES, *sc*PTZ i rotarod u myszy po podaniu dootrzewnowym) były bardzo obiecujące i wykazały korzystną aktywność przeciwdrgawkową wielu pochodnych w dawkach 100 i 300 mg/kg w teście MES, przy umiarkowanej neurotoksyczności, obserwowanej głównie w dawce 300 mg/kg. *N*-cynamoidowe pochodne aminoalkanoli, w przeciwieństwie do opisanych w publikacjach **H1** i **H2** pochodnych *N*-cynamylowych, wykazały także aktywność przeciwdrgawkową w teście *sc*PTZ (w dawkach 100 i 300 mg/kg), co zdecydowanie poszerza profil farmakologiczny tych związków i decyduje o możliwości wykazywania innego mechanizmu działania. Jak wspomniano wcześniej, aktywność w teście MES koreluje z możliwością hamowania napięciowo-zależnych kanałów sodowych

i wapniowych, aktywacji kanałów potasowych, czy też inhibicją receptorów NMDA lub AMPA. Z kolei skuteczność w teście *scPTZ* wykazują związki blokujące kanały wapniowe oraz wpływające na układ GABAergiczny [15,64]. Większość badanych związków cechowała się krótkim czasem działania i wykazywała aktywność przeciwdrgawkową po 0,5 godzinie od podania, natomiast w testach przeprowadzonych po 4 godzinach nie chroniła zwierząt przed wystąpieniem drgawek. Wyjątkiem były pochodne zawierające w grupie amidowej komponentę *trans*-4-aminocykloheksanolu (związki **19** i **20**), które w teście MES (myszy, *i.p.*) wykazywały aktywność przeciwdrgawkową wyłącznie po 4 godzinach od podania, przy braku neurotoksyczności. Obserwowany czas aktywności może sugerować korzystny profil metabolizmu badanych pochodnych. Bardzo korzystne wyniki otrzymano również w teście 6-Hz (32 mA, myszy, *i.p.*). Wybrane do badań pochodne **6**, **11** i **17** chroniły testowane zwierzęta przed wystąpieniem drgawek po 0,25; 0,5 i 1 godzinie od podania, a pochodna *trans*-4-aminocykloheksanolu (związek **19**) również w tym teście cechowała się opóźnionym czasem działania i wykazała najlepszą aktywność po 2 i 4 godzinach od podania. Najaktywniejsze związki **6** i **11** były także badane w teście 6-Hz przy 44 mA, uważanym za model drgawek lekoopornych [61,65], w którym aktywność wykazują jedynie nieliczne obecnie stosowane leki przeciwpadaczkowe. Również w tym wariancie związki **6** i **11** chroniły wszystkie badane zwierzęta przed wystąpieniem drgawek po 0,25 i 0,5 godzinie od podania.



Rycina 14. Struktury najaktywniejszych przeciwdrgawkowo związków opisanych w publikacji **H4**.

Wyniki przeprowadzonych w kolejnym etapie badań ilościowych na myszach w testach MES, *scPTZ*, 6-Hz i rotarod dla związków **6**, **11** i **19** (**Ryc. 14**) zostały przedstawione w **Tabeli 1**. Na uwagę zasługuje fakt, że związek **11** był również testowany po podaniu doustnym i wykazał zadowalającą aktywność przeciwdrgawkową. Otrzymane wartości parametrów farmakologicznych ED₅₀ i TD₅₀ zestawiono z parametrami kwasu walproinowego i karbamazepiny, które należą do ważnych leków pierwszego rzutu w terapii padaczki. Leki te wykazują odmienny profil aktywności klinicznej i komórkowy mechanizm działania.

Tabela 1. Wyniki badań ilościowych związków **6**, **11** i **19** przeprowadzonych na myszach oraz wartości parametrów farmakologicznych wybranych leków przeciwpadaczkowych.

Związek	Droga podania	Test	TPE [h]	ED ₅₀ [mg/kg] lub TD ₅₀ [mg/kg]	PI
6	<i>i.p.</i>	MES	0,25	53,8	3,65
		<i>sc</i> PTZ	0,25	90,3	2,18
		6-Hz (32 mA)	0,25	57,6	3,41
		6-Hz (44 mA)	0,5	92,9	2,12
		rotarod	0,25	196,5	
11	<i>i.p.</i>	MES	0,5	55,6	3,24
		<i>sc</i> PTZ	0,5	102,2	1,76
		6-Hz (32 mA)	0,5	42,3	4,26
		6-Hz (44 mA)	0,25	51,3	3,51
		rotarod	0,25	180,0	
	<i>p.o.</i>	MES	1,0	92,5	>5,41
		<i>sc</i> PTZ	1,0	131,8	>3,79
		6-Hz (44 mA)	1,0	120,0	>4,17
		rotarod	-	>500	
19	<i>i.p.</i>	MES	2,0	186,0	3,22
		<i>sc</i> PTZ	2,0	316,7	1,90
		rotarod	6,0	>600	
Kwas walproinowy	<i>i.p.</i>	MES		263	1,51
		<i>sc</i> PTZ		220	1,81
		6-Hz (32 mA)		126	3,16
		6-Hz (44 mA)		310	1,28
		rotarod		398	
Karbamazepina	<i>i.p.</i>	MES		7,8	5,81
		<i>sc</i> PTZ		>50	<0,91
		6-Hz (32 mA)		47,9	0,95
		rotarod		45,4	

TPE - *time to peak effect*; PI (indeks protekcji) obliczany jako TD₅₀/ED₅₀; dane farmakologiczne leków pochodzą z referencji [60-61].

Kwas walproinowy jest stosowany w napadach uogólnionych: mioklonicznych, toniczno-klonicznych, atonicznych i nieświadomości oraz napadach częściowych: prostych, złożonych, i wtórnie uogólnionych, a także w zespole Lennox-Gastauta [66]. Za główny mechanizm jego aktywności uważa się blokowanie napięciowo-zależnych kanałów wapniowych, ale również wpływ na przewodność GABAergiczną poprzez blokowanie transaminazy GABA i transportera GABA [9,17,67]. Karbamazepina jest rekomendowana w napadach częściowych: prostych, złożonych i wtórnie uogólnionych, a także w napadach uogólnionych u dorosłych i dzieci, natomiast w napadach nieświadomości jest zazwyczaj nieskuteczna [68]. Jej głównym mechanizmem działania jest inhibicja napięciowo-zależnych kanałów

sodowych, ale uważa się, że może ona również blokować napięciowo-zależne kanały wapniowe typu T [17,69]. Aktywność farmakologiczna testowanych związków **6**, **11** i **19** koresponduje z działaniem kwasu walproinowego (aktywność w testach MES, *sc*PTZ i 6-Hz), a różni się od karbamazepiny, która wykazuje znikomą aktywność w testach *sc*PTZ i 6-Hz, a jej działanie przeciwdrgawkowe zaznaczone jest głównie w teście MES.

Związki **6** i **11** testowano również na szczurach po podaniu doustnym i dootrzewnym w testach MES, *sc*PTZ i neurotoksyczności. Otrzymane wyniki były bardzo obiecujące, przedstawiono je w poniższej **Tabeli 2**.

Tabela 2. Wyniki badań ilościowych związków **6** i **11** przeprowadzonych na szczurach oraz wartości parametrów farmakologicznych wybranych leków przeciwpadaczkowych.

Związek	Droga podania	Test	TPE [h]	ED ₅₀ [mg/kg] lub TD ₅₀ [mg/kg]	PI
6	<i>i.p.</i>	MES	0,5	21,2	3,74
		<i>sc</i> PTZ	0,5	64,4	1,23
		TOX	1,0	79,5	
	<i>p.o.</i>	MES	0,5	46,77	5,92
		TOX	4,0	276,7	
11	<i>i.p.</i>	MES	0,5	41,9	1,66
		<i>sc</i> PTZ	0,5	56,0	1,25
		TOX	0,5	69,8	
	<i>p.o.</i>	MES	0,5	77,3	6,47
		TOX	-	>500	
Kwas walproinowy	<i>p.o.</i>	MES		485	1,62
		<i>sc</i> PTZ		646	1,21
		TOX		784	
Karbamazepina	<i>p.o.</i>	MES		5,35	68,04
		<i>sc</i> PTZ		>250	<1,46
		TOX		364	

TPE - *time to peak effect*; PI (indeks protekcji) obliczany jako TD₅₀/ED₅₀; dane farmakologiczne leków pochodzą z referencji [60-61].

W porównaniu z karbamazepiną, ED₅₀ w teście MES związków **6** i **11** jest mniej korzystne, ale odmienny jest też profil aktywności, gdyż badane związki były również aktywne w teście *sc*PTZ. W porównaniu z kwasem walproinowym, który jest aktywny zarówno w teście MES jak i *sc*PTZ, otrzymane wartości ED₅₀ i indeksu protekcji (obliczanego jako TD₅₀/ED₅₀) dla związków **6** i **11** są dużo korzystniejsze. Badania przeprowadzone po podaniu doustnym związków wskazują, że ulegają one wchłanianiu z przewodu pokarmowego, co świadczy o poprawie biodostępności *N*-cynamoilowych

pochodnych aminoalkanoli w porównaniu z opisanymi w publikacjach **H1** i **H2** analogami *N*-cynamylowymi, które nie były aktywne przeciwdrgawkowo w tej drodze podania.

Wnioski z przeprowadzonej analizy zależności pomiędzy strukturą i aktywnością przeciwdrgawkową są następujące:

- potwierdzono doniesienia literaturowe o korzystnym wpływie hydrofobowego podstawnika elektrono-akceptorowego (zastosowano atom chloru) w położeniu *para* pierścienia fenyłowego. Wszystkie pochodne z atomem chloru były bardziej aktywne od ich niepodstawionych i *para*-metylowych analogów;
- optymalna odległość pomiędzy azotem amidowym i grupą hydroksylową *N*-podstawnika łańcuchowego (nie cyklicznego) wynosi 2 atomy węgla;
- dla pochodnych z podstawnikiem *N*-4-hydroksycykloheksylowym (odległość NH-OH wynosząca 4 atomy węgla) aktywność przeciwdrgawkowa występowała po dłuższym czasie (np. dla związku **19** czas od podania dootrzewnowego do wystąpienia aktywności wynosi 2 godziny), co może być spowodowane powstawaniem aktywnego metabolitu.

Dla pochodnych **6** i **11** przeprowadzono badania krystalograficzne, mające na celu zarówno potwierdzenie struktury, w tym konfiguracji, jak i pomiary odległości pomiędzy elementami farmakoforowymi. Opisane związki posiadały co najmniej trzy istotne dla aktywności przeciwdrgawkowej elementy farmakoforowe: domenę hydrofobową (pierścień fenyłowy), domenę wiążącą wodory (grupa amidowa z wolnym wodorem przy azocie, ang. *hydrogen bonding domain*) i jeden dodatkowy element strukturalny o właściwościach akceptorowo-donorowych wiązań wodorowych (grupa hydroksylowa w podstawniku przy azocie grupy amidowej). Pomiary odległości pomiędzy tymi elementami posłużyły do opracowania proponowanego modelu farmakoforowego.

Wykonane badania przewidywania metabolizmu związków **6** i **11** z wykorzystaniem szczurzych mikrosomów wątrobowych wykazały, że są one stabilne i ulegają przemianom jedynie w zakresie 3-4% ilościowych po 30 minutowej inkubacji.

Obiecujące wyniki badań *in vivo* były przesłanką do przeprowadzenia poszukiwania mechanizmu działania związków **6** i **11** poprzez badanie potencjalnego powinowactwa

do 80 celów molekularnych obejmujących receptory, kanały jonowe oraz transportery w stężeniu 100 μM (badania wykonane komercyjnie w firmie Cerep (Francja)). Otrzymane wyniki wskazują, że związek **6** może znacząco konkurować z odpowiednim radioligandem przy wiązaniu do receptora benzodiazepinowego (53% wiązania), receptorów serotonergicznym 5-HT_{2B} (58,2% wiązania) oraz receptora prostaglandynowego EP2 (57,6% wiązania). Z kolei związek **11**, spośród przebadanych 80 celów molekularnych, wykazał jedynie wiązanie do receptora serotonergicznego 5-HT_{1A} (76,6% wiązania). Otrzymane wyniki wykazały, że związki mogą działać poprzez wpływ na układ serotonergiczny, jednak profil aktywności farmakologicznej w badaniach *in vivo* sugeruje, że nie jest to jedyny komórkowy mechanizm działania. Wskazane byłyby dalsze badania obejmujące inne cele molekularne np. podrodzinę receptora waniloidowego przejściowego potencjału (TRPV1) czy też deacetylazy histonowe.

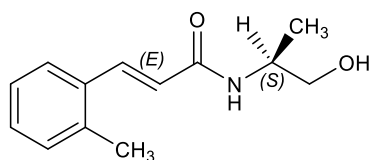
Podsumowując, przeprowadzone badania umożliwiły identyfikację co najmniej trzech bardzo aktywnych, stabilnych metabolicznie związków, tj.

- *R,S*-(2*E*)-3-(4-chlorofenylo)-*N*-(1-hydroksybut-2-yl)prop-2-enamidu (**6**),
- *R,S*-(2*E*)-3-(4-chlorofenylo)-*N*-(2-hydroksypropyl)prop-2-enamidu (**11**),
- (2*E*)-3-(4-chlorofenylo)-*N*-(4-hydroksycyloheksyl)prop-2-enamidu (**19**) (**Ryc. 14**),

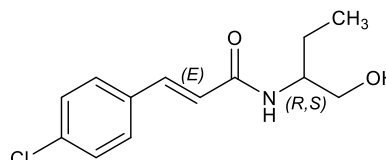
które wykazały obiecującą aktywność przeciwdrgawkową w testach na gryzoniach w drgawkach indukowanych elektrycznie (MES, 6-Hz) oraz chemicznie (*sc*PTZ), zarówno po podaniu dootrzewnowym jak i doustnym.

H5 Gunia-Krzyżak A(*), Bareyre FM, Marona H, Waszkielewicz AM. **Four N-(E)-cinnamoyl (cinnamamide) derivatives of aminoalkanols with promising anticonvulsant and analgesic activity.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2019, DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.04.006

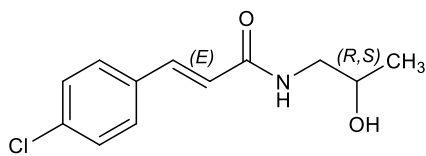
Prezentowana publikacja **H5** stanowi kontynuację badań nad poprzednio zidentyfikowanymi i prezentowanymi powyżej w publikacji **H4** *N*-(*E*)-cynamoilo pochodnymi aminoalkanoli podstawionymi w pierścieniu fenylovym grupą metylową w pozycji *orto* (związek **1**) lub atomem chloru w pozycji *para* (związki **2-4**) (**Ryc. 15**).



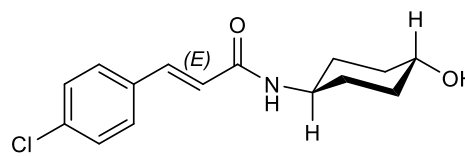
Związek 1 (związek 5 w publikacji H4)



Związek 2 (związek 6 w publikacji H4)



Związek 3 (związek 11 w publikacji H4)



Związek 4 (związek 19 w publikacji H4)

Rycina 15. Struktury związków będących przedmiotem publikacji H5 z odpowiadającymi im numerami przypisanymi w publikacji H4.

Publikacja H5 zawiera wyniki poszerzonych zaawansowanych testów aktywności farmakologicznej w zakresie działania przeciwdrgawkowego, hamującego zmiany wtórne w przebiegu urazowego uszkodzenia mózgu i/lub przeciwbólowego testowanych związków.

Badania w zakresie działania przeciwdrgawkowego i przeciwbólowego zostały wykonane w NIH. Związki 1-3 badano w teście drgawek indukowanych dożylną infuzją pentylenetertazolu (*iv*MET) przeprowadzonym na myszach. Związki podawano dootrzewnowo w dawkach odpowiadającym ED₅₀ w teście MES oraz TD₅₀ w teście rotarod (myszy, *i.p.*). W badaniu potwierdzono aktywność przeciwdrgawkową dla wszystkich badanych związków, gdyż powodowały one podwyższenie progu drgawkowego wraz ze zwiększającą się dawką chemokonwulsanta. W modelu drgawek rozniecanych elektrycznie za pomocą elektrod dorogówkowych u myszy (*corneal kindled mice*) wyznaczono dla badanych związków parametr ED₅₀, który wynosił 36,8 mg/kg dla zw. 1, 25,7 mg/kg dla zw. 2 i 51,1 mg/kg dla zw. 3. W przeprowadzonym *in vitro* badaniu pobudliwości elektrycznej fragmentów hipokampa pobranych od szczurów, którym uprzednio podawano kwas kainowy wykazano dla związku 2 znaczącą redukcję ilości wyładowań.

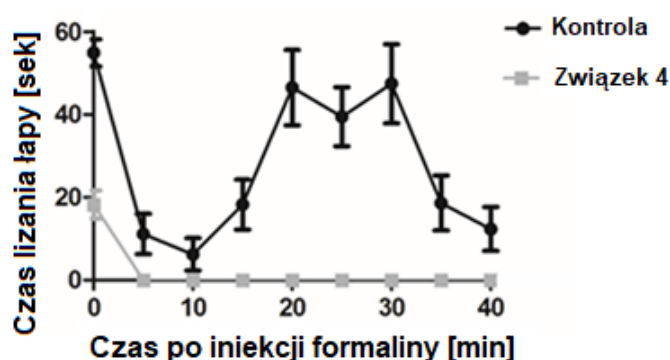
Szczególnie korzystna aktywność farmakologiczna została wykazana dla związku 4 w teście formalinowym na myszach. Zakłada on podanie formaliny do tylnej kończyny zwierzęcia, co powoduje charakterystyczne odruchowe zachowanie jakim jest lizanie miejsca podania substancji. Łączny czas lizania jest uważany za odpowiednik natężenia odczuwanego przez zwierzę bólu. Charakterystyczne jest występowanie dwóch faz odpowiedzi. W fazie pierwszej (ostrej), trwającej około 10 minut, powstawanie bólu jest związane z bezpośrednim

pobudzeniem obwodowych włókien czuciowych i bólowych. W fazie drugiej (zapalnej) ból jest skutkiem uwalniania mediatorów stanu zapalnego z uszkodzonych tkanek i zakończeń nerwowych. Zmniejszenie czasu lizania kończyny jest uważane za wykazywanie aktywności przeciwbólowej, natomiast aktywność w drugiej fazie testu odpowiada korzystnemu działaniu w bólu neuropatycznym. Grupę kontrolną stanowią zwierzęta, którym podaje się sam rozpuszczalnik (np. metylocelulozę). Związek **4** badany w dawce 186 mg/kg odpowiadającej ED₅₀ w teście MES (myszy, *i.p.*) skracał czas lizania łapy o około 88% w pierwszej fazie i o 100% w drugiej fazie testu (**Tabela 3, Ryc. 16**). Wykazano zatem jego szczególnie korzystne działanie przeciwbólowe.

Tabela 3. Wyniki testu formalinowego wykonanego dla związku **4** w dawce 186 mg/kg (myszy, *i.p.*)

Faza testu	Pole pod krzywą (AUC)		% Kontroli±SEM	Wartość <i>p</i>
	Kontrola*	Związek 4		
Ostra	208,94	45,74	21,89±4,07	< 0,01
Zapalna	898,84	0,00	0,00	< 0,01

*myszy kontrolne otrzymały metylocelulozę zamiast badanego związku



Rycina 16. Wyniki testu formalinowego wykonanego dla związku **4** w dawce 186 mg/kg (myszy, *i.p.*).

Ponadto w publikacji **H5** opisano wyniki wykonanych przeze mnie badań związków **1** i **2** w modelu urazowego uszkodzenia mózgu u myszy. Przesłanką do wykonania tych prac były przedstawione wcześniej doniesienia literaturowe o możliwości hamowania zmian wtórnych w przebiegu urazowego uszkodzenia mózgu przez substancje wykazujące aktywność przeciwdrgawkową [22]. Badania w tym zakresie wykonałam podczas stażu w Instytucie Neuroimmunologii Klinicznej Uniwersytetu Ludwika i Maksymiliana w Monachium w 2015 roku.

U uśpionych myszy wykonywano kraniotomię i uwidaczniano mózg, po czym stosowano uszkodzenie mózgu z zastosowaniem aparatu pozwalającego na wykonanie takiego samego

urazu u wszystkich badanych zwierząt (TBI-0310 Impactor, Precision System and Instrumentation LLC). Po zabezpieczeniu rany, myszy powracały to normalnej aktywności, a badane związki były podawane dootrzewnowo 0,5 godz. po eksperymencie, a następnie 2 razy dziennie przez 3 dni (grupa badana n=8). Zastosowano dawki 43 mg/kg (dla zw. **1**) lub 54 mg/kg (dla zw. **2**) w 0,5% metylocelulozie, tj. ED₅₀ w teście MES u myszy, *i.p.* Grupy kontrolne stanowiły zwierzęta, którym podawano 0,5% metylocelulozę (n=8) i takie, którym nie podawano żadnych dodatkowych substancji (n=8). Czwartego dnia po eksperymencie myszy były usypiane i wykonywana była perfuzja z zastosowaniem buforu fosforanowego i 4% paraformaldehydu. Mózgi precyzyjnie izolowano, inkubowano w 30% sacharozie i przechowywano w -20°C. Następnie wykonywano preparaty z ciętych poprzecznie mózgow, grubość otrzymywanych fragmentów wynosiła 50 μM. Fragmenty znaczone immunohistochemicznie, aby możliwe było uwidocznienie rany w mikroskopie fluorescencyjnym. Na otrzymanych zdjęciach (jak na **Ryc. 17**) obliczano obszar uszkodzenia mózgu wykorzystując program ImageJ. Analizowano wszystkie fragmenty z widoczną raną oddalone o 300 μM i obliczano objętość uszkodzenia stosując wzór $\{0,5A_1 + 0,5(A_1 + A_2) + \dots + 0,5(A_{n-1} + A_n) + 0,5A_n\} X$, gdzie A to powierzchnia rany dla każdego fragmentu, a X to odległość pomiędzy dwoma analizowanymi fragmentami. Badane związki nie powodowały zmniejszenia objętości rany, która wynosiła 11,09±0,88 mm³ dla związku **1** i 11,44±0,79 mm³ dla związku **2**, w porównaniu z grupami kontrolnymi (11,9±0,7 mm³ dla grupy nie otrzymującej żadnego leczenia i 11,7±1,0 mm³ dla grupy otrzymującej metylocelulozę).



Rycina 17. Przekrój poprzeczny mózgu myszy poddanej eksperymentowi urazowego uszkodzenia mózgu, wybarwionego immunohistochemicznie, z uwidocznioną uszkodzoną tkanką mózgową w prawej półkuli.

Podsumowując, badane związki wykazały korzystną aktywność przeciwdrgawkową u myszy w teście drgawek indukowanych dożylną infuzją pentylenetertazolu i modelu drgawek rozniecanych elektrycznie za pomocą elektrod dorogówkowych. Związek **4** charakteryzował się niezwykle korzystną aktywnością przeciwbólową wykazaną w teście formalinowym u myszy.

H6 Gunia-Krzyżak A, Żesławska E, Bareyre FM, Nitek W, Waszkielewicz AM, Marona H. Physicochemical and biological evaluation of a cinnamide derivative R,S-(2E)-1-(3-hydroxypiperidin-1-yl)-3-phenylprop-2-en-1-one (KM-608) for nervous system disorders. *Chemical Biology & Drug Design*, 2017, 90(2):244-252.

Tytułowy związek publikacji **H6**, *R,S-(2E)-1-(3-hydroxypiperidyn-1-yl)-3-fenylprop-2-en-1-on (KM-608)* stanowi pochodną *N*-cynamoilową, w której azot grupy amidowej jest wbudowany w pierścień 3-hydroxypiperidyny. Związek ten został zaproponowany jako struktura odniesienia **C** (**Ryc. 4**, str. 18). Jego szeroka aktywność farmakologiczna *in vivo* na gryzoniach w zakresie testów maksymalnego elektrowstrząsu, drgawek indukowanych podskórną iniekcją pentylenetrazolu, testu 6-Hz, badań neurotoksyczności oraz testu formalinowego została przedstawiona w mojej rozprawie doktorskiej, a otrzymane wyniki były na tyle obiecujące, że już w okresie po doktoracie został on zakwalifikowany do badań poszerzonych, co wymagało jego resyntezy. Łącznie do NIH wysłano 8,15 g substancji.

W publikacji **H6** zamieszczono wyniki analizy krystalograficznej potwierdzające strukturę chemiczną związku. **KM-608** jest III-rzędowym amidem kwasowym, a więc nie posiada w swojej strukturze wolnego wodoru w grupie amidowej, a tym samym nie występuje tu ważny element farmakoforowy - domena wiążąca wodory (ang. *hydrogen bonding domain*). Pomimo tej różnicy w strukturze w porównaniu z najbardziej aktywnymi pochodnymi *N*-cynamoiloaminoalkanoli opisanymi w publikacjach **H4** i **H5**, związek **KM-608** wykazał bardzo korzystną aktywność przeciwdrgawkową i przeciwbólową.

Publikacja **H6** zawiera wyniki badań farmakologicznych związku **KM-608**, w tym badań przesiewowych i ilościowych w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej w testach MES (myszy, szczury), *scPTZ* (myszy, szczury), 6-Hz (myszy) oraz aktywności przeciwbólowej w teście formalinowym (myszy). Poszerzone badania przeprowadzone w NIH objęły trzy modele drgawek rozniecanych: myszy stymulowane dorogówkowo bodźcami elektrycznymi, szczury stymulowane bodźcami elektrycznymi w obszarze hipokampu oraz szczury odporne na lamotryginę stymulowane bodźcami elektrycznymi w obszarze ciała migdałowatego.

Jak wspomniano wcześniej, test MES pozwala zidentyfikować substancje aktywne u ludzi w uogólnionych napadach toniczno-klonicznych, natomiast aktywność w teście *scPTZ* może prognozować skuteczność danej substancji w napadach nieświadomości u ludzi [15,64]. Test 6-Hz, w szczególności z zastosowaniem prądu o natężeniu 44 mA, jest uważany za model drgawek lekoopornych [61]. Natomiast modele drgawek rozniecanych naśladują

proces epileptogenezy, gdyż stosowane przez określony czas odpowiednie bodźce podprogowe wywołują szereg zmian w zachowaniu zwierząt oraz czynności elektrycznej mózgu, powodując w efekcie samoistne występowanie drgawek. Uważa się, że można przy ich pomocy przewidzieć skuteczność związku w zapobieganiu wystąpieniu padaczki, a w szczególności hamowania rozszerzania ogniska drgawkowego i wtórnego uogólnienia drgawek ogniskowych. Ponadto test wykorzystujący szczury odporne na lamotryginę stymulowane bodźcami elektrycznymi w obszarze ciała migdałowatego jest jednocześnie modelem drgawek opornych [64].

We wszystkich modelach w badaniach przesiewowych **KM-608** wykazał obiecującą aktywność i wyznaczono dla niego parametry ED₅₀, które były porównywalne lub lepsze od ED₅₀ wybranych obecnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych takich jak kwas walproinowy, karbamazepina, lamotrygina, czy lewetiracetam. W **Tabeli 4** zestawiono wartości ED₅₀, TD₅₀ i indeksów protekcji w wykonanych testach dla związku **KM-608** i wybranych leków przeciwpadaczkowych. Profil aktywności badanej substancji był zbliżony do kwasu walproinowego, a otrzymane parametry farmakologiczne były korzystniejsze dla związku **KM-608**. Karbamazepina i lamotrygina są nieaktywne w teście scPTZ, a lewetiracetam w badaniach przedklinicznych został zidentyfikowany jako kandydat na lek dopiero w teście 6-Hz, gdyż w standardowych testach MES i scPTZ jest nieaktywny. Warto zwrócić szczególną uwagę na korzystną aktywność przeciwdrgawkową związku **KM-608** w modelach drgawek opornych: 6-Hz przy 44 mA (myszy, *i.p.*, ED₅₀=67,2 mg/kg) oraz w teście drgawek rozniecanych elektrycznie w obszarze ciała migdałowatego na szczurach opornych na lamotryginę (podanie dootrzewnowe związku, ED₅₀=36,0 mg/kg).

Ponadto w publikacji **H6** opisano wyniki badań związku **KM-608** w modelu urazowego uszkodzenia mózgu u myszy, wykonane przeze mnie podczas stażu w Instytucie Neuroimmunologii Uniwersytetu Ludwika i Maksymiliana w Monachium w 2015 roku. Metodykę doświadczeń opisano powyżej (publikacja **H5**). Związek **KM-608** powodował nieznaczne zmniejszenie objętości rany (do 10,6±0,9 mm³) w porównaniu z grupami kontrolnymi (11,9±0,7 mm³ dla grupy nie otrzymującej żadnego leczenia i 11,7±1,0 mm³ dla grupy otrzymującej metylocelulozę), jednak wykazana różnica nie była istotna statystycznie.

Tabela 4. Parametry farmakologiczne związku **KM-608** oraz wybranych leków przeciwpadaczkowych.

Test	Parametry farmakologiczne: ED ₅₀ lub TD ₅₀ [mg/kg]					
	KM-608	PI	Kwas walproinowy	Karbamazepina	Lamotrigina	Lewetiracetam
MES (myszy, <i>i.p.</i>)	55,0 (48,3-60,8) ^a 43,9 (38,6-49,6) ^{a,d}	2,5 3,0	263 (237-282)[60]	7,8 (6,3-8,5)[60]	7,5 (6,1-9,1)[60]	>500[60]
scPTZ (myszy, <i>i.p.</i>)	82,3 (62,7-102,3) ^a 92,3 (81,0-100,1) ^{a,d}	1,7 1,4	220 (177-268)[60]	>50[60]	>40[60]	>500[60]
TOX (myszy, <i>i.p.</i>)	138,9 (108,5-156,3) ^a 133,0 (123,0-146,3) ^{a,d}		398 (356-445)[60]	45,4 (32,9- 54,5)[60]	30,0 (24,8-36,2)[60]	>500[60]
MES (myszy, <i>p.o.</i>)	48,9 (37,2-51,1) ^a	>10,2				
scPTZ (myszy, <i>p.o.</i>)	70,0 (47,4-89,9) ^a	>7,1				
TOX (myszy, <i>p.o.</i>)	>500 ^a					
MES (szczury, <i>p.o.</i>)	43,5 (31,7-57,9) ^b	>11,5	485 (324-677)[60]	5,4 (3,3-7,6)[60]	1,3 (0,9-1,6)[60]	>500[60]
scPTZ (szczury, <i>p.o.</i>)	118,0 (78,6-162,7) ^b	>4,2	646 (466-869)[60]	>250[60]	>412[60]	
TOX (szczury, <i>p.o.</i>)	>500 ^c		784 (503-1176)[60]	364 (223-500)[60]	411 (305-512)[60]	>500[60]
MES (szczury, <i>i.p.</i>)	29,9 (17,3-47,4) ^a	4,5				
scPTZ (szczury, <i>i.p.</i>)	22,2 (12,3-33,6) ^a	6,1				
TOX (szczury, <i>i.p.</i>)	134,4 (119,0-153,1) ^a					
6-Hz, 32 mA (myszy, <i>i.p.</i>)	60,6 (52,2-71,1) ^a 48,9 (32,5-68,9) ^{a,d}	2,3 2,7	126,0 (94,5-152,0) [61]	47,9 (27,4- 94,2)[61]	100,4 (79,7-121,4)[70]	19,4 (9,9- 36,0)[61]
6-Hz, 44 mA (myszy, <i>i.p.</i>)	67,2 (55,9-79,7) ^a	2,1	310 (258-335)[61]	nieaktywny	nieaktywny	1089 (787- 2650)[61]
Drgawki rozniecane dorongówkowo (myszy, <i>i.p.</i>)	28,4 (14,4-42,7) ^a	4,9	728,0 (509,6- 1016,8)[70]	143,5 (109,6- 173,5)[70]	37,1 (22,6-54,7)[70]	57,0 (21,2- 114,0)[70]
Drgawki rozniecane na hipokampie (szczury, <i>i.p.</i>)	29,6 (21,2-43,4) ^a	4,5	1287,5 (882,0- 1660,6)[70]	119,4 (69,4- 195,5)[70]	61,3 (33,6-110,1)[70]	Maks.protekcja 50% w dawce 352,5 mg/kg[71]
Oporne na lamotryginę drgawki rozniecane na ciele migdałowatym (szczury, <i>i.p.</i>)	36,0 (24,0-44,4) ^a	3,7	aktywny w dawce 300 mg/kg[72]	nieaktywny do 40 mg/kg (dawki neurotoksycznej)[7 2]	-	Nieaktywny[72]

PI (indeks protekcji) obliczany jako TD₅₀/ED₅₀, ^aCzas = 0,25 h, ^bCzas=0,5 h, ^cCzas=1,0 h, ^dWyniki dla myszy żeńskich

Ostatnim etapem prac opisanych w publikacji **H6** była próba ustalenia komórkowego mechanizmu działania związku **KM-608**. Dla substancji o aktywności przeciwdrgawkowej cel molekularny często jest identyfikowany dopiero po wykazaniu korzystnej aktywności w testach *in vivo*, a dla większości leków przeciwpadaczkowych został on poznany już po ich wprowadzeniu do terapii. Dla niektórych, w tym dla kwasu walproinowego, pomimo intensywnych badań, nie został on dotychczas do końca wyjaśniony. Wiadomo, że aktywność w teście MES koresponduje przede wszystkim z blokowaniem napięciowo-zależnych kanałów sodowych, choć także z aktywacją kanałów potasowych, blokowaniem kanałów wapniowych, czy też receptorów NMDA lub AMPA, natomiast w teście *scPTZ* z blokowaniem napięciowo- zależnych kanałów wapniowych lub aktywacją układu GABAergicznego [17,73]. Związek **KM-608** był aktywny zarówno w teście MES jak i *scPTZ* oraz w modelu drgawek opornych na lamotryginę u szczurów, co sugeruje, że jego mechanizm działania jest odmienny od mechanizmu tego leku tj. blokowania napięciowo-zależnych kanałów sodowych. Dodatkowo dla związku **KM-608** zostały wykonane badania powinowactwa do 80 potencjalnych celów molekularnych obejmujących receptory, kanały jonowe oraz transportery (badania wykonane komercyjnie w firmie Cerep (Francja)). **KM-608** w stężeniu 100 μM efektywnie konkurował z radioligandami receptora sigma (47,4% wiązania) i transportera dopaminy (77,5% wiązania). Mechanizm działania związku **KM-608** w zakresie aktywności przeciwdrgawkowej nie został do końca wyjaśniony, wskazane byłyby dalsze badania obejmujące inne cele molekularne np. receptory TRPV1 czy też badania elektrofizjologiczne (np. *patch clamp*) receptora GABA.

H7 Żesławska E, Nitek W, Marona H, Gunia-Krzyżak A. **Cinnamide pharmacophore for anticonvulsant activity: evidence from crystallographic studies.** *Acta Crystallographica Section C*, 2018, C74(Pt7):782-788.

Publikacja **H7** stanowi podsumowanie prac w zakresie opracowania modelu farmakoforu pochodnych kwasu cynamonowego wykazujących aktywność przeciwdrgawkową. Są w niej zebrane i przedstawione wyniki rentgenowskiej analizy strukturalnej wybranych pochodnych amidu kwasu cynamonowego wykazujących zróżnicowaną aktywność przeciwdrgawkową, których synteza, właściwości fizykochemiczne oraz wyniki badań farmakologicznych zostały uprzednio opublikowane (prace **H4**, **H5**, **H6** i **P4**).

Koncepcja pracy opiera się na założeniu, że aktywność przeciwdrgawkowa badanych pochodnych wynika z obecności odpowiednich elementów strukturalnych, stanowiących istotne elementy farmakoforowe. Są to wspomniane wcześniej:

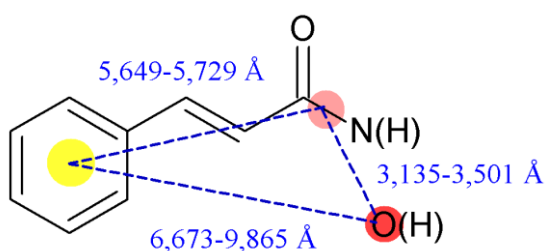
- domena hydrofobowa (pierścień fenyłowy);
- domena wiążąca wodory (grupa amidowa z wolnym wodorem przy azocie);
- dodatkowy element strukturalny o właściwościach akceptorowo-donorowych wiązań wodorowych (grupa hydroksylowa w podstawniku przy azocie grupy amidowej).

Analiza pomiędzy strukturą i aktywnością przeciwdrgawkową w grupie amidowych pochodnych kwasu cyamonomowego była przedmiotem wcześniej przytoczonych publikacji **H4**, **H5**, **H6** i **P4**. W pracy **H7** do rozważań wykorzystano tylko pochodne nie podstawione w pierścieniu fenyłowym, aby uzupełnić wiedzę na temat wpływu podstawnika *N*-alkilowego na aktywność. Wykazano *m.in.*, że korzystna dla aktywności jest obecność w podstawniku *N*-alkilowym grupy hydroksylowej posiadającej właściwości akceptorowo-donorowe wiązań wodorowych, w porównaniu z grupą ketonową, będącą jedynie akceptorem wiązań wodorowych (**P4**). Ponadto zaproponowano, że optymalna odległość pomiędzy azotem amidowym i grupą hydroksylową *N*-podstawnika łańcuchowego (nie cyklicznego) wynosi 2 atomy węgla (**P4**, **H4**). Wyniki badań farmakologicznych związku **KM-608** (publikacja **H6**) pozwalają stwierdzić, że obecność wodoru w grupie amidowej nie jest warunkiem niezbędnym do występowania aktywności przeciwdrgawkowej w analizowanej grupie pochodnych amidu kwasu cyamonomowego, a więc nie jest konieczna obecność wspomnianej wcześniej domeny wiążącej wodory.

Wykorzystanie rentgenowskiej analizy strukturalnej pozwoliło *m.in.* na wykazanie, że dwa ważne elementy strukturalne: pierścień aromatyczny jako układ hydrofobowy i grupa amidowa jako układ donorowo-akceptorowy/akceptorowy wiązań wodorowych wykazują niewielkie zmiany we wzajemnym położeniu. Natomiast lokalizacja atomu tlenu w podstawniku *N*-alkilowym różni się znacząco swoim położeniem wśród analizowanych pochodnych. Ponadto analiza krystalograficzna umożliwiła przeanalizowanie oddziaływań międzycząsteczkowych z zaangażowaniem grupy amidowej i hydroksylowej w celu identyfikacji nowego potencjalnego czynnika determinującego aktywność przeciwdrgawkową. W analizowanej grupie związków, pochodne tworzące łańcuchy przez wiązanie O-H \cdots O z wykorzystaniem atomu tlenu grupy amidowej i grupy hydroksylowej wykazały wyższą aktywność przeciwdrgawkową. Związki nieaktywne

w dawce 100 mg/kg (MES, myszy, *i.p.*) nie tworzą łańcuchów z wykorzystaniem grupy hydroksylowej lecz za pomocą wiązania N-H...O lub formują pierścienie.

Analiza struktur krystalicznych związków posłużyła jako narzędzie do wyznaczenia precyzyjnych odległości pomiędzy elementami strukturalnymi, istotnymi dla aktywności przeciwdrgawkowej, co umożliwiło zaproponowanie modelu farmakoforowego pochodnych kwasu cynamonowego (**Ryc. 18**). Do pomiaru odległości posłużyły wcześniej zdefiniowane centroid pierścienia aromatycznego i centroid wiązania amidowego, a także atom tlenu jako donor elektronów.



Rycina 18. Zaproponowany model farmakoforu dla amidowych pochodnych kwasu cynamonowego wykazujących aktywność przeciwdrgawkową.

W zaproponowanym modelu farmakoforowym charakterystyczne jest to, że odległości pomiędzy grupą amidową a pierścieniem fenylowym i atomem tlenu w podstawniku *N*-alkilowym mają zbliżoną wartość we wszystkich omawianych związkach, natomiast trzecia mierzona odległość - pomiędzy pierścieniem fenylowym i atomem tlenu - jest dużo bardziej zróżnicowana. Co więcej, nie wpisuje się ona również w zaproponowany przez Khana i wsp. model farmakoforu dla związków wykazujących aktywność w teście MES [63], co może wynikać z szerszej aktywności przeciwdrgawkowej amidowych pochodnych kwasu cynamonowego obejmującej poza testem MES także testy *scPTZ* i 6-Hz.

5.3.4. Podsumowanie

a) W wyniku modyfikacji strukturalnych związków odniesienia **A** i **B** otrzymano **25** finalnych nowych pochodnych charakteryzujących się bardzo korzystną aktywnością przeciwdrgawkową i/lub przeciwbólową. Wybrane związki były aktywne *in vivo* w modelach drgawek lekoopornych wywoływanych u gryzoni, zarówno po podaniu dootrzewnowym jak i doustnym.

- b) Pochodne *N*-cynamoilowe wykazały korzystniejsze właściwości w porównaniu z *N*-cynamyłowymi analogami w zakresie aktywności w teście *scPTZ* oraz skuteczności po podaniu doustnym.
- c) Analiza zależności pomiędzy strukturą i aktywnością przeciwdrgawkową w grupie badanych związków wykazała:
- korzystny wpływ atomu chloru w położeniu *para* pierścienia fenyłowego;
 - optymalna odległość pomiędzy azotem amidowym i grupą hydroksylową *N*-podstawnika łańcuchowego (nie cyklicznego) wynosi 2 atomy węgla;
 - wydłużony czas działania przeciwdrgawkowego dla pochodnych z podstawnikiem *N*-4-hydroksycykloheksylowym w porównaniu ze związkami posiadającymi *N*-podstawniki acykliczne;
 - obecność domeny wiążącej wodory w cząsteczce związku nie jest warunkiem koniecznym do wykazywania aktywności przeciwdrgawkowej.
- d) Wśród związków posiadających chlor w pozycji *para* pierścienia fenyłowego, dwie pochodne:
- *R,S*-(2*E*)-3-(4-chlorofenylo)-*N*-(1-hydroksybutan-2-yl)prop-2-enamid (zw. **2**, **Ryc. 15**)
 - *R,S*-(2*E*)-3-(4-chlorofenylo)-*N*-(2-hydroksypropylo)prop-2-enamid (zw. **3**, **Ryc. 15**),
- wykazały szczególnie korzystną aktywność przeciwdrgawkową potwierdzoną w testach MES, *scPTZ*, *ivPTZ*, 6-Hz i/lub drgawki rozniecane elektrycznie na myszach.
- Natomiast (2*E*)-3-(4-chlorofenylo)-*N*-(4-hydroksycykloheksylo)prop-2-enamid (zw. **4**, **Ryc. 15**) wykazał szczególnie korzystną aktywność przeciwbólową w obu fazach testu formalinowego przeprowadzonego na myszach.
- e) Pochodna niepodstawiona w pierścieniu fenyłowym zawierająca jako podstawnik w grupie amidowej 3-hydroksypiperydynę (*R,S*-(2*E*)-1-(3-hydroksypiperydyn-1-yl)-3-fenyloprop-2-en-1-on (**KM-608**, **Ryc. 4**) wykazała aktywność przeciwdrgawkową w testach MES, *scPTZ*, 6-Hz i trzech modelach drgawek rozniecanych: myszy stymulowane dorogówkowo bodźcami elektrycznymi, szczury stymulowane bodźcami elektrycznymi w obszarze hipokampu oraz szczury odporne na lamotryginę stymulowane bodźcami elektrycznymi w obszarze ciała migdałowatego.

f) Wykazana aktywność farmakologiczna dla najaktywniejszych związków charakteryzuje się wyjątkowo szerokim profilem aktywności, który posiada jedynie kilka obecnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych.

g) Zbadano aktywność trzech pochodnych wykazujących aktywność przeciwdrgawkową

- *S*-(2*E*)-*N*-(1-hydroxypropan-2-yl)-3-(2-methylphenyl)prop-2-enamide (zw. **1**, **Ryc. 15**)
- (*R,S*-(2*E*)-3-(4-chlorofenylo)-*N*-(1-hydroksybutan-2-ylo)prop-2-enamid (zw. **2**, **Ryc. 15**)
- (*R,S*-(2*E*)-1-(3-hydroksypiperydyn-1-yl)-3-fenyloprop-2-en-1-on (**KM-608**, **Ryc. 4**)

w modelu zmian wtórnych w przebiegu urazowego uszkodzenia mózgu u myszy. Nie wykazano dla nich korzystnej aktywności, choć związek **KM-608** zmniejszał objętość rany pourazowej w porównaniu z grupami kontrolnymi.

h) Molekularny mechanizm działania wybranych aktywnych pochodnych obejmuje powinowactwo do receptora sigma i transportera dopaminy dla *R,S*-(2*E*)-1-(3-hydroksypiperydyn-1-yl)-3-fenyloprop-2-en-1-onu (**KM-608**, **Ryc. 4**), receptor benzodiazepinowy, receptor serotonergiczny 5-HT_{2B} i receptor prostaglandynowy EP2 dla *R,S*-(2*E*)-3-(4-chlorofenylo)-*N*-(1-hydroksybutan-2-ylo)prop-2-enamidu (zw. **2**, **Ryc. 15**) oraz receptor serotonergiczny 5-HT_{1A} dla *R,S*-(2*E*)-3-(4-chlorofenylo)-*N*-(2-hydroksypropylo)prop-2-enamidu (zw. **3**, **Ryc. 15**).

i) Na podstawie badań krystalograficznych zaproponowano model farmakoforowy amidowych pochodnych kwasu cynamonowego wykazujących aktywność przeciwdrgawkową, który obejmuje: domenę hydrofobową (pierścień fenyłowy) w odległości 5,649-5,729 Å od domeny wiążącej wodory (HBD) i 6,673-9,865 Å od donora wiązań wodorowych (D) zlokalizowanego w *N*-podstawniku grupy amidowej, oraz dystans pomiędzy HBD i D wynoszący 3,135-3,501 Å.

Zarówno doniesienia literaturowe jak i własne prace wskazują, że pochodne kwasu cynamonowego wykazują wielokierunkowe korzystne działanie w obrębie układu nerwowego, warto więc prowadzić badania w tej grupie związków, gdyż mogą przyczynić się one do wyselekcjonowania potencjalnych leków. Innym możliwym zastosowaniem najaktywniejszych związków jest wykorzystanie ich jako substancji wzorcowych w testach do oceny aktywności innych związków.

6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

6.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Studia magisterskie na kierunku Farmacja na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM w Krakowie ukończyłam w **2008** roku uzyskując najlepszą średnią ocen pośród absolwentów wynoszącą 4,88. Przygotowywanie pracy magisterskiej pod kierunkiem pani prof. dr hab. Elżbiety Pękali pt. „**Otrzymywanie metabolitów denbufiliny metodą mikrobiologiczną**” było dla mnie pierwszą okazją do samodzielnej pracy naukowej. Niezwykle inspirujący wpływ pani Promotor i pierwsze sukcesy (praca magisterska zdobyła drugie miejsce w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich) spowodowały, że podjęłam decyzję o kontynuowaniu edukacji na studiach doktoranckich.

Z chwilą podjęcia studiów doktoranckich tj. w **2008** roku, zostałam włączona do prac badawczych prowadzonych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM pod kierunkiem pana profesora Henryka Marony. W kręgu moich naukowych zainteresowań znalazły się zagadnienia dotyczące poszukiwania farmakologicznie aktywnych związków. Największą i najważniejszą częścią wykonywanej przeze mnie pracy laboratoryjnej były wówczas syntezy chemiczne i badania fizykochemiczne związków organicznych, w szczególności pochodnych chiralnych i achiralnych aminoalkanoli z komponentą cynamoilową, cynamylową, ksantonu, czy też fenoksyalkilową. Główny przedmiot syntez stanowiły związki cechujące się odpowiednimi właściwościami fizykochemicznymi (m.in. masa cząsteczkowa, współczynnik podziału), które umożliwiłyby pokonywanie bariery krew-mózg w celu wykazania określonego działania w układzie nerwowym, tj. przeciwpadaczkowego i/lub przeciwbólowego. Po potwierdzeniu czystości i tożsamości otrzymywanych związków przekazywałam je do badań farmakologicznych. Współpracowałam w tym zakresie z Narodowym Instytutem Zdrowia w Stanach Zjednoczonych (w ramach umowy pomiędzy Instytutem i Uniwersytetem Jagiellońskim Collegium Medicum). Realizowałam w tym czasie w roli kierownika projekt finansowany przez Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum ze środków MNiSW w ramach dotacji celowej na rozwój młodych naukowców:

- „Poszukiwanie aktywnych przeciwdrgawkowo połączeń w grupie pochodnych aminoalkanoli” (**2011-2013**).

Wiele otrzymanych przeze mnie związków wykazało bardzo korzystne właściwości przeciwdrgawkowe, a ich parametry farmakologiczne były porównywalne lub przewyższające obecnie stosowane leki przeciwpadaczkowe. Rezultaty realizacji projektu zostały częściowo opublikowane w pracy **D4**, w której zostały opisane pochodne *N-(E)*-cynamoilo i *N-(E)*-2-fenylocynamoilo aminoalkanoli o zróżnicowanej aktywności. Związkiem o interesującym profilu aktywności okazała się pochodna 4-aminocykloheksanolu, która w dawce 100 mg/kg wykazywała aktywność przeciwdrgawkową w teście MES u myszy zarówno po 0,5 jak i 4 godzinach od podania dootrzewnego, a neurotoksyczność tylko po 0,5 godzinie od podania, co może sugerować korzystny profil metabolizmu. Wyniki prac przeprowadzonych w ramach w/w projektu zawarłam również w mojej rozprawie doktorskiej.

Ponadto od 2009 roku brałam udział w roli wykonawcy w projektach badań statutowych realizowanych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej UJ CM pod kierownictwem prof. dr. hab. Henryka Marony:

- „Synteza i badania fizyko-chemiczne oraz farmakologiczno-biologiczne w grupie pochodnych amin, aminoalkanoli i alkanoloamidów” (2009-2011);
- „Badania syntetyczne, fizykochemiczne oraz mikrobiologiczno-farmakologiczne w grupie pochodnych arenów” (2012-2014).

Moja rola w w/w projektach polegała na wykonywaniu syntez i badań fizykochemicznych związków organicznych z grup pochodnych ksantenu, piperazyny oraz aminoalkanoli o potencjalnej aktywności farmakologicznej. Prace badawczo-naukowe zaowocowały wówczas współautorstwem pięciu publikacji oryginalnych, dotyczących aktywności otrzymanych związków, w tym aktywności przeciwdrgawkowej (prace **D1**, **D5**, **D6**), aktywności α -adrenergicznej i hipotensyjnej (praca **D2**) oraz aktywności przeciwnowotworowej (praca **M1**).

Od 2010 roku byłam również zaangażowana w wykonywanie zadań badawczych w projekcie finansowanym ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (kierownik: prof. dr hab. Henryk Marona):

- „Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej” (2010-2014).

Do moich obowiązków, podobnie jak w innych projektach, należały synteza i badania fizykochemiczne związków organicznych z grupy pochodnych chiralnych i achiralnych aminoalkanoli. Część wyników otrzymanych w ramach tego projektu, dotyczących syntezy amidowych pochodnych kwasu cynamonowego o aktywności przeciwpadaczkowej i przeciwbólowej, zawarłam w mojej rozprawie doktorskiej. Efektem realizacji projektu była także publikacja przeglądowa **D3** dotycząca aspektów klinicznych i przedklinicznych wykorzystania związków o aktywności przeciwpadaczkowej także w terapii bólu neuropatycznego.

Ważną kwestią mojej aktywności przed uzyskaniem stopnia doktora były aspekty komercjalizacji wyników badań naukowych. Jestem współtwórczynią polskiego patentu (zgłoszenie **2012** r, patent **2015** r) i europejskiego zgłoszenia patentowego (**2013**), które objęły tematyką wybrane pochodne kwasu cynamonowego wykazujące szczególnie obiecujące właściwości przeciwdrgawkowe i/lub przeciwbólwe. W **2013** roku uczestniczyłam ponadto w dwumiesięcznym stażu w ramach programu „**TOP 500 Innovators Science-Management-Commercialization**”, zorganizowanym i finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, odbyłym w Center for Executive Education na Uniwersytecie Kalifornijskim (Berkeley, USA). Ogólnym celem programu było podniesienie kwalifikacji pracowników sektora B&R, a tematyka odbytych zajęć dotyczyła między innymi współpracy nauki z gospodarką, zarządzaniem badaniami naukowymi i komercjalizacji wyników badań.

Dodatkowo w kręgu moich zainteresowań naukowych od początku zatrudnienia w Zakładzie Chemii Bioorganicznej UJ CM znalazły się zagadnienia związane z kosmetologią, a w szczególności z chemią surowców kosmetycznych. Poszerzając swoją wiedzę w tym zakresie przygotowałam publikacje przeglądowe w polskojęzycznych czasopismach z listy B MNiSW (**M2** i **M5**) i rozdział w monografii (**M4**). Dotyczyły one wykorzystania czterech generacji retinoidów w medycynie i kosmetologii (**M2**), udziale kwasu liponowego w komórkowych mechanizmach antyoksydacyjnych (**M4**) oraz możliwości zastosowania pochodnych aldehydu, alkoholu i kwasu cynamonowego w kosmetykach (**M5**).

Innym kierunkiem podejmowanych przeze mnie prac badawczych były doświadczenia biotechnologiczne w zakresie metod służących otrzymywaniu czystych enancjomerów z racematów. Tematyka ta jest dla mnie istotna, gdyż syntezowałam m.in. chiralne pochodne,

a badania farmakologiczne powinny zostać przeprowadzone zarówno dla racematów jak i poszczególnych enancjomerów. W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystywałam trzy gatunki grzyba strzępkowego z rodzaju *Cunninghamella*. Wyniki prac w tym zakresie prac zostały opisane w mojej pracy doktorskiej i były one bardzo obiecujące. Wstępne próby potwierdziły potencjał wybranych drobnoustrojów do stereoselektywnej oksydacji alkoholi drugorzędowych do odpowiednich ketonów.

Wynikiem przeprowadzonych prac dotyczących nowych związków posiadających komponentę aminoalkanolową o aktywności przeciwdrgawkowej była moja wyróżniona rozprawa doktorska zatytułowana „*Struktura a aktywność przeciwdrgawkowa w grupie pochodnych aminoalkanoli*” wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Henryka Marony. Tytuł doktora nauk farmaceutycznych w dziedzinie chemii leków uzyskałam w **2013** roku. Na podstawie pracy doktorskiej zostałam nagrodzona trzecią nagrodą w ogólnopolskim konkursie **Lider Nauk Farmaceutycznych**, w którym doceniono przede wszystkim jej potencjał aplikacyjny.

Podsumowanie dorobku naukowego przed otrzymaniem stopnia doktora:

Liczba publikacji: **9**

Sumaryczny *impact factor*: **12,350**

Łączna liczba punktów MNiSW: **144**

1 polskie zgłoszenie patentowe

6.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Badania przeprowadzone w ramach doktoratu, których wyniki zostały zamieszczone w mojej rozprawie doktorskiej opublikowałam jako autor pierwszy i korespondujący w pracach **P4** (*Eur J Med Chem*, IF₂₀₁₆: 4,519) i **P6** (*Chirality*, IF₂₀₁₆: 1,956). Publikacje ukazały się dopiero w **2016** roku, gdyż tytułowe związki wykazały na tyle interesującą aktywność farmakologiczną, że były badane także po obronie doktoratu w celu uzyskania pełniejszych wyników potencjału przeciwdrgawkowego i/lub przeciwbólowego. Dodatkowo, już po obronie doktoratu rozpoczęłam współpracę dotyczącą badań krystalograficznych otrzymanych przeze mnie amidowych pochodnych kwasu cynamonowego, których wyniki zostały częściowo zawarte w w/w pracach. W publikacji **P4**, na podstawie wyników badań aktywności przeciwdrgawkowej w testach MES, *scPTZ* i/lub 6-Hz wykonanych

dla 16 amidowych pochodnych kwasu cynamonowego, opisano następujące zależności pomiędzy strukturą i aktywnością:

- i) modyfikacje fragmentu aminoalkanolowego (np. acetylacja, utlenienie grupy hydroksylowej) prowadziły do obniżenia aktywności,
- ii) łańcuchowy podstawnik *N*-alkilowy był korzystniejszy w porównaniu z *N*-podstawnikiem cyklicznym,
- iii) optymalna wartość wyznaczonego eksperymentalnie parametru lipofilowości R_{M0} wynosiła od 1,390 do 2,219.

Zawarto tutaj także wstępne wyniki oceny bezpieczeństwa najbardziej aktywnych związków *R,S*-(2*E*)-*N*-(1-hydroksypropan-2-ylo)-3-fenyloprop-2-enamid (**1**), *R,S*-(2*E*)-*N*-(2-hydroksypropylo)-3-fenyloprop-2-enamid (**3**), *R,S*-(2*E*)-*N*-(2-hydroksybutylo)-3-fenyloprop-2-enamid (**8**) i *R,S*-(2*E*)-*N*-(1-hydroksy-3-metylobutan-2-ylo)-3-fenyloprop-2-enamid (**11**). Test Ames, wykazał, że związki nie są mutagenne, a testy wykonane *in vitro* na komórkach ludzkiej hepatomy (HepG2) udowodniły brak efektu cytotoksycznego do stężenia 100 μ M. Publikacja **P6** dotyczyła porównania aktywności przeciwdrgawkowej wybranych par enancjomerów, *N*-(*E*)-cynamoilo pochodnych *R*- i *S*-2-aminopropan-1-olu oraz *R*- i *S*-2-aminobutan-1-olu. Struktury związków, w tym konfiguracja chiralnego atomu węgla, została potwierdzona z zastosowaniem rentgenowskiej analizy strukturalnej. Związki, poza testami przesiewowymi (MES, scPTZ), były badane na szczurach w modelu drgawek indukowanych pilokarpiną (ang. *pilocarpine induced status prevention*, PISP), który zaliczany jest do modeli stanu padaczkowego, a także do zwierzęcych modeli epileptogenezy. Tytułowe związki wykazały w nim zadowalającą aktywność, chroniąc do 100% badanych zwierząt przed wystąpieniem stanu padaczkowego i znacznie ograniczając śmiertelność.

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam prace badawcze w zakresie syntezy i badań fizykochemicznych związków o potencjalnej aktywności farmakologicznej. Bazując na doświadczeniach zdobytych podczas realizacji doktoratu wprowadziłam szereg modyfikacji strukturalnych, w wyniku których otrzymałam związki charakteryzujące się korzystniejszą aktywnością przeciwdrgawkową i przeciwbólową. Realizacja tych zadań stanowi osiągnięcie naukowe opisane w punkcie 5 niniejszego Autoreferatu. Wyniki prac zaprezentowałam także podczas Forum Współpracy dla Rozwoju Innowacji w Life Science (Kraków, 8 X 2013) podczas wystąpienia pt.: „**Nowe amidowe pochodne aminoalkanoli oraz ich zastosowanie do wytwarzania leków**”.

W okresie od listopada **2014** do kwietnia **2015** roku, z własnej inicjatywy odbyłam 6-cio miesięczny staż (finansowany z programu Skills-Staże Fundacji na Recz Nauki Polskiej) w Instytucie Neuroimmunologii Klinicznej na Uniwersytecie Ludwika i Maksymiliana w Monachium (opiekun stażu dr hab. Florence Bareyre), podczas którego badałam potencjalną aktywność neuroprotekcijną i neuroregeneracyjną w zwierzęcym modelu urazowego uszkodzenia mózgu otrzymanych przeze mnie związków. Wyniki przeprowadzonych badań zostały częściowo opublikowane w wyżej opisanych pracach **H5** i **H6**, włączonej do głównego osiągnięcia naukowego.

Współpraca w zakresie badań krystalograficznych z dr Ewą Żesławską z Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie, pozwoliła na opracowanie modelu farmakoforowego amidowych pochodnych kwasu cyjankowego wykazujących aktywność przeciwdrgawkową, opisanego w publikacji **H7**, włączonej do głównego osiągnięcia naukowego przedstawionego w punkcie 5 niniejszego Autoreferatu. Ponadto w publikacji **P10** przedstawiono potencjał rentgenowskiej analizy strukturalnej wybranych amidowych pochodnych kwasu cyjankowego w poszukiwaniu nowych związków o aktywności przeciwdrgawkowej.

Wykonywane przeze mnie prace syntetyczne i analizy fizykochemiczne dotyczyły również związków organicznych z innych grup, gdyż byłam zaangażowana jako wykonawca zadań badawczych w realizację projektów badań statutowych, kierowanych przez prof. dr. hab. Henryka Maronę:

- „Badania syntetyczne, fizykochemiczne oraz mikrobiologiczno-farmakologiczne w grupie pochodnych arenów” (**2012-2014**).
- „Badania syntetyczne, fizykochemiczne, farmakologiczne oraz wstępna ocena bezpieczeństwa w grupie pochodnych aminoalkanoli” (**2015-2017**).
- „Poszukiwanie nowych związków w grupie pochodnych ksantenu o potencjalnej aktywności biologicznej” (**2018-2019**).

Rezultatem prac prowadzonych w ramach tych projektów były badania i wyniki opisane w kilku kolejnych publikacjach z moim udziałem. Aktywność przeciwdrgawkowa wybranych *N*-(2,5-dimetylofenoksy) i *N*-[(2,3,5-trimetylofenoksy)alkilo]aminoalkanoli (w tym związków otrzymanych przeze mnie) była przedmiotem publikacji **P2**. Związki wykazały zadowalającą aktywność w teście MES, przy czym analiza zależności pomiędzy strukturą i aktywnością

pozwoili na stwierdzenie, że w przypadku komponenty aminoalkanolowej korzystne są m.in. 2-aminopropan-1-ol, 1-aminopropan-2-ol i 2-aminobutan-1-ol. Dodatkowo pochodne 2,3,5-trimetylowe były aktywniejsze od analogów 2,5-dimetylowych. Nie wykazano korelacji pomiędzy długością łącznika pomiędzy grupą fenoksyową i komponentą aminoalkanolową (etylowy vs. propylowy) a aktywnością przeciwdrgawkową. Uczestniczyłam także w zadaniach badawczych dotyczących pochodnych ksantonu, dla których, w zależności od rodzaju podstawników, została wykazana wielokierunkowa aktywność farmakologiczna obejmująca aktywność przeciwnowotworową (publikacje **P8** i **P11**), czy też działanie przeciwzapalne (publikacja **P14**). Ponadto w powstałej w ramach jednego z ww. projektów publikacji przeglądowej **P3** opisano rolę układu serotonergicznego w padaczce i bólu neuropatycznym na przykładzie ligandów poszczególnych typów receptorów 5-HT.

Po obronie pracy doktorskiej kontynuowałam również zadania w ramach projektu „**Opracowanie innowacyjnej grupy związków o aktywności stabilizującej potencjał błony komórkowej**”. Obejmowały one wówczas, poza opisanymi wcześniej pochodnymi kwasu cynamonowego, także badania w grupach *N*-(fenoksy)alkilo- i *N*-2-[2-(fenoksy)etoksy]etylo- aminoalkanoli. Ich rezultatem było współautorstwo polskiego patentu, europejskiego zgłoszenia patentowego oraz publikacji **P6**. Jednym z najaktywniejszych związków z opisanych serii był *R*-(-)-2*N*-{2-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etoksy]etylo}aminopropan-1-ol, który wykazał korzystną aktywność przeciwdrgawkową ($ED_{50}=12,92$ mg/kg MES, myszy, *i.p.*) oraz przeciwbólową (faza ostra testu formalinowego, myszy, *i.p.*). W badaniach powinowactwa do celów molekularnych stwierdzono jako jego mechanizm działania inhibicję receptorów sigma, napięciowo-zależnych kanałów sodowych oraz receptorów sertonergicznych 5-HT_{1A} i 5-HT_{2B}. W ramach projektu powstała z moim udziałem także publikacja przeglądowa **P1** obejmująca tematyką kanały jonowe jako cele terapeutyczne w ośrodkowym układzie nerwowym.

Aktualnym tematem badawczym podjętym po uzyskaniu stopnia doktora była ocena hamowania procesu melanogenezy przez pochodne kwasu cynamonowego i ksantonu. Zaburzenia hiperpigmentacyjne widoczne jako ciemne miejsca, plamy lub zmiany na skórze są wynikiem nieprawidłowej ilości i/lub depozycji barwnika (melaniny) w skórze, a poszukiwanie nowych skutecznych i bezpiecznych związków do miejscowego leczenia hiperpigmentacji stanowi aktualne i istotne zagadnienie z uwagi na niewystarczającą skuteczność obecnie stosowanych związków. Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe

wskazujące na możliwe właściwości depigmentacyjne wybranych pochodnych kwasu cynamonowego oraz własne doświadczenie w syntezie tego typu związków, zdecydowałam się podjąć prace w tym zakresie. Dotychczas badałam zsyntezowane związki w modelu *in vitro* wykorzystując komercyjnie dostępną tyrozinazę z pieczarki dwuzarodnikowej oraz *in silico*, w których stosując model tyrozinazy poszukiwałam potencjalnego miejsca dokowania inhibitora. Wstępne korzystne wyniki były przedmiotem pięciu prac magisterskich (których byłam promotorem) oraz trzech doniesień konferencyjnych. Zagadnienia dotyczące strategii poszukiwania inhibitorów melanogeny uwzględniające różnorodne metody *in vitro* oraz *in vivo*, opisałam także w publikacji przeglądowej **P9**. Natomiast praca **M8** dotyczy metod leczenia zaburzeń hipopigmentacyjnych.

W następnym etapie badań wykorzystam linie komórkowe czerniaka, dzięki którym możliwe będzie potwierdzenie aktywności uprzednio zidentyfikowanych inhibitorów tyrozinazy, a także identyfikacja potencjalnych inhibitorów melanogenezy o innym mechanizmie działania. Badania w tym zakresie będę kontynuowała w roli kierownika ramach projektu finansowanego z Narodowego Centrum Nauki w konkursie **Miniatura I**:

- „Charakterystyka profilu aktywności nowych inhibitorów melanogenezy w grupach pochodnych kwasu cynamonowego i ksantonu” (2019-2020).

Zagadnienia kosmetyczne były ponadto przedmiotem pracy **P4**, w której opisano badania metabolizmu skórno przeprowadzone *in silico* z wykorzystaniem programu MetaSite. Związkami badanymi były wybrane retinoidy stosowane w terapii schorzeń skóry. Monografia opublikowana w oficynie krajowej **M10** dotyczyła zastosowania metod biotechnologicznych do otrzymywania surowców kosmetycznych. Natomiast w kolejnych dwóch publikacjach przeglądowych zamieszczonych w czasopiśmie z listy B MNiSW opisano przyczyny łysienia i wybrane metody jego leczenia (**M6**) oraz wykorzystanie metod *in vitro* w badaniach kosmetyków promieniochronnych (**M9**). Praca **M9** wiąże się bezpośrednio z projektem finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Opus, kierowanym przez prof. dr hab. Elżbietę Pękałą:

- „Nowoczesna fotoprotekcja - opracowanie skutecznych i bezpiecznych filtrów UV w grupach pochodnych arylidenohydantoiny i kwasu cynamonowego” (2017-2020).

W projekcie pełnię funkcję wykonawcy zadań badawczych w zakresie syntezy i badań fizykochemicznych wybranych pochodnych (*E*)-cynamylowych oraz badań *in vitro* związków

o potencjalnej aktywności promieniochronnej. Aktywność promieniochronna związków jest badana według normy ISO 24443:2012, z zastosowaniem referencyjnego aparatu SPF-290AS Analyser (Solar Light, USA), który pozwala na wyznaczenie parametrów ochrony przeciwsłonecznej takich jak SPF_{in vitro} i UVA PF w formułacjach kosmetycznych. Rezultatem pracy w projekcie była również publikacja przeglądowa **P13**. Praca ta, w której jestem autorem pierwszym i korespondencyjnym, dotyczy zastosowania pochodnych kwasu cynamonowego w kosmetykach. Omówiono w niej zarówno obecne funkcje tych pochodnych w kosmetykach tj. m.in. zastosowanie jako surowce zapachowe, filtry UV, antyoksydanty, czy też surowce przeciwdrobnoustrojowe, a także perspektywy zastosowania jako inhibitory melanogenezy czy też surowce przeciwstarzeniowe.

Jestem także wykonawcą zadań badawczych w innym projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w konkursie Sonata, kierowanym przez dr Paulinę Koczurkiewicz:

- „Nowe amidowe pochodne kwasu cynamonowego jako inhibitory reduktaz karbonylowych, modulujące aktywność doksorubicyny - nowa perspektywa w terapii nowotworów” (2017-2020).

Moja rola w tym projekcie polega na syntezie i ocenie właściwości fizykochemicznych pochodnych kwasu cynamonowego, które są badane w kierunku aktywności cytotoksycznej na szerokim panelu komórek nowotworowych, także jako substancje o działaniu synergicznym do doksorubicyny. W wyniku współpracy podczas realizacji projektu powstała z moim udziałem publikacja przeglądowa **P15**, która dotyczy metod syntezy i aktywności przeciwnowotworowej analogów piperlonguminy, pochodnej kwasu cynamonowego uważanej za wzorcową substancję o działaniu przeciwnowotworowym.

Ponadto długoletnia współpraca z pracownikami Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej UJ CM, dr hab. Elżbietą Karczewską, dr Danutą Trojanowską i dr Karoliną Klesiewicz dotyczy badań otrzymanych przeze mnie pochodnych amin i amidów w kierunku wykazywania działania przeciwdrobnoustrojowego: przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybicznego. Wyniki badania aktywności hamującej wzrost *Helicobacter pylori* wykazywanej przez wybrane pochodne amidowe zostały opisane w pracy **P12**.

Obecnie jestem kierownikiem projektu celowego realizowanego w ramach dotacji na rozwój młodych naukowców pt. „**Badania aktywności biologicznej w modelach *in vitro* i *in silico* syntetycznych związków organicznych z grupy pochodnych chiralnych i achiralnych aminoalkanoli**” (2017, 2019), w ramach którego wykonuję syntezy, badania fizykochemiczne, a także badania aktywności biologicznej w zakresie działania hamującego melanogenezę, antyoksydacyjnego i/lub fotoprotekcyjnego wybranych pochodnych aminoalkanoli.

Jestem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr Justyny Popiół, której praca dotyczy poszukiwania nowych substancji o aktywności promieniochronnej. W latach **2014-2019** opiekowałam się 9 magistrantami, 4 na kierunku Farmacja i 5 na kierunku Kosmetologia. W latach **2012-2015** opiekowałam się Studenckim Kołem Naukowym przy Pracowni Chemii Kosmetycznej UJ CM, w ramach którego studenci byli przygotowywani do wykonywania zadań badawczych oraz wystąpień publicznych. Przygotowana przez członkinie koła praca „Searching for new compounds with tyrosinase inhibitory activity” prezentowana podczas International Medical Students Conference (Kraków, 10-12 IV **2014**) zdobyła wyróżnienie.

Moje osiągnięcia naukowe zostały trzykrotnie wyróżnione nagrodą Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w latach **2013, 2015** oraz **2017**. W grudniu **2017** otrzymałam na drodze konkursu 36-cio miesięczne stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnego młodego naukowca.

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

Liczba publikacji: **18**

Sumaryczny *impact factor* : **45,589**

Łączna liczba punktów MNiSW: **409**

2 polskie patenty, **2** europejskie zgłoszenia patentowe

6.3. Podsumowanie całego dorobku naukowego

Łączna liczba publikacji: **34**, w tym

- publikacje znajdujące się w bazie Journal Citation Reports: **28**
- pozostałe publikacje: **6**

Sumaryczny *impact factor* (według wartości IF z danego roku publikacji): **78,763**

Łączna liczba punktów MNiSW: **702**

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science Core Collection®: **218**

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science Core Collection® (bez autocytań): **170**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science Core Collection® i według bazy Scopus: **9**

Indeks Hirscha bez autocytań według bazy Scopus: **7**

2 polskie patenty, **2** europejskie zgłoszenia patentowe

Liczba realizowanych projektów badawczych: **13**, w tym:

- jako kierownik projektu: **4**
- jako wykonawca: **9**

Łączna liczba streszczeń ze zjazdów: **42**, w tym:

- międzynarodowych: **23**
- krajowych: **19**

7. Piśmiennictwo

- [1] K.T. Thakur, E. Albanese, P. Giannakopoulos, N. Jette, M.J. Prince, T.J. Steiner, et al., Neurological disorders, in: V. Patel, D. Chisholm, T. Dua, R. Laxminarayan, M.E. Medina-Mora (Eds.), *Mental, Neurological, and Substance Use Disorders. Disease Control Priorities, Third Edition*, International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, Washington, 2015: pp. 87–108.
- [2] *Neurological Disorders: Public Health Challenges*. Geneva, World Health Organization 2006
- [3] R. Sridharan, *Epidemiology of epilepsy*, *Curr. Sci.* 82 (2002) 664–670.
- [4] D.M. Treiman, *Management of refractory complex partial seizures: current state of the art*, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 6 (2010) 297–308.
- [5] P.N. Banerjee, D. Filippi, W. Allen Hauser, *The descriptive epidemiology of epilepsy - a review*, *Epilepsy Res.* 85 (2009) 31–45.
- [6] J. Majkowski, *Padaczka w codziennej praktyce lekarza*, *Przew. Lek.* 3 (2000) 44–48.
- [7] R. Nickel, C.E. Silvado, F.M.B. Germiniani, L. De Paola, N.L. Da Silveira, J.R.B. De Souza, et al., *Quality of life issues and occupational performance of persons with epilepsy*, *Arq. Neuropsiquiatr.* 70 (2012) 140–144.
- [8] J. Jędrzejczak, *Leczenie nowo zdiagnozowanej padaczki*, *Pol. Przegląd Neurol.* 1,2 (2005) 65–70.
- [9] R. Sankar, A. Mazarati, *Neurobiology of depression as a comorbidity of epilepsy*, in: J.L. Noebels, M. Avoli, M.A. Rogawski, R.W. Olsen, A. V Delgado-Escueta (Eds.), *Jasper's Basic Mechanisms of Epilepsies*, 4th Edition, Oxford University Press, 2012: pp. 1–16.
- [10] B.A. Neubauer, S. Gross, A. Hahn, *Epilepsy in childhood and adolescence*, *Dtsch. Arztebl. Int.* 105 (2008) 319–327. doi:10.3238/arztebl.2008.0319.
- [11] D. Ryglewicz, *Padaczka u osób starszych*, *Pol. Przegląd Neurol.* 6 (2010) 190–195.
- [12] S. Weil, C. Deppe, S. Noachtar, *The treatment of women with epilepsy*, *Dtsch. Arztebl. Int.* 107 (2010) 787–793.
- [13] M.J. Brodie, *Management strategies for refractory localization-related seizures*, *Epilepsia.* 42 Suppl 3 (2001) 27–30.
- [14] E. Perucca, F.G. Gilliam, *Adverse effects of antiepileptic drugs*, *Lancet Neurol.* 11 (2012) 792–802.
- [15] K. Rejda, *Współczesne algorytmy diagnostyczne i standardy terapeutyczne w nowo rozpoznanej padaczce u dorosłych*, *Pol. Przegląd Neurol.* 6 (2010) 131–136.
- [16] M. Bialer, *Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs)*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 887–895.
- [17] M. Bialer, H.S. White, *Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs*, *Nat. Reviews Drug Discov.* 9 (2010) 68–82.
- [18] T.W. McAllister, *Neurobehavioral sequelae of traumatic brain injury: Evaluation and management*, *World Psychiatry.* 7 (2008) 3–10.
- [19] B. Kulesza, J. Litak, C. Grochowski, J. Kulesza, A. Nogalski, *Urazowe uszkodzenie mózgu*, *J. Educ. Heal. Sport.* 6 (2016) 215–221.
- [20] N. Marklund, A. Bakshi, D. Castelbuono, V. Conte, T. McIntosh, *Evaluation of pharmacological treatment strategies in traumatic brain injury*, *Curr. Pharm. Des.* 12 (2006) 1645–1680.
- [21] K. McConeghy, J. Hatton, L. Hughes, A. Cook, *A review of neuroprotection pharmacology and therapies in patients with acute traumatic brain injury*, *CNS Drugs.* 26 (2012) 613–636.

- [22] S. Margulies, R. Hicks, T.C.T. for T.B.I.W. Leaders, Combination therapies for traumatic brain injury: prospective considerations, *J. Neurotrauma*. 26 (2009) 925–939.
- [23] S. Chen, H. Wu, D. Klebe, Y. Hong, J. Zhang, Valproic acid: a new candidate of therapeutic application for the acute central nervous system injuries, *Neurochem. Res.* 39 (2014) 1621–1633.
- [24] F. Yu, Z. Wang, M. Tanaka, C.-T. Chiu, P. Leeds, Y. Zhang, et al., Posttrauma cotreatment with lithium and valproate: reduction of lesion volume, attenuation of blood-brain barrier disruption, and improvement in motor coordination in mice with traumatic brain injury, *J. Neurosurg.* 119 (2013) 766–773.
- [25] P.K. Dash, S.A. Orsi, M. Zhang, R.J. Grill, S. Pati, J. Zhao, et al., Valproate administered after traumatic brain injury provides neuroprotection and improves cognitive function in rats, *PLoS One*. 5 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0011383.
- [26] A. Imam, G. Jin, M. Duggan, M. Sillesen, J. Hwabejire, C. Jepsen, et al., Synergistic effects of fresh frozen plasma and valproic acid treatment in a combined model of traumatic brain injury and hemorrhagic shock, *Surgery*. 154 (2013) 388–396.
- [27] R.C. Hoover, M. Motta, J. Davis, K.E. Saatman, S.T. Fujimoto, H.J. Thompson, et al., Differential effects of the anticonvulsant topiramate on neurobehavioral and histological outcomes following traumatic brain injury in rats, *J. Neurotrauma*. 21 (2004) 501–512.
- [28] B.S. Chang, D.H. Lowenstein, Antiepileptic drug prophylaxis in severe traumatic brain injury: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, *Neurology*. 60 (2003) 10–16.
- [29] F. Yu, Z. Wang, F. Tchantchou, C.-T. Chiu, Y. Zhang, D.-M. Chuang, Lithium ameliorates neurodegeneration, suppresses neuroinflammation, and improves behavioral performance in a mouse model of traumatic brain injury, *J. Neurotrauma*. 29 (2012) 362–374.
- [30] Z.F. Zhu, Q.G. Wang, B.J. Han, C.P. William, Neuroprotective effect and cognitive outcome of chronic lithium on traumatic brain injury in mice, *Brain Res. Bull.* 83 (2010) 272–277.
- [31] E. Schaible, J. Windschügl, W. Bobkiewicz, Y. Kaburov, L. Dangel, T. Krämer, et al., 2-Methoxyestradiol confers neuroprotection and inhibits a maladaptive HIF-1 α response after traumatic brain injury in mice, *J. Neurochem.* 129 (2014) 940–954.
- [32] P.K. Dash, S.A. Orsi, A.N. Moore, HDAC inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury, *Neuroscience*. 163 (2009) 1–8.
- [33] A. Szczudlik, J. Dobrogowski, J. Wordliczek, A. Stępień, M. Krajnik, W. Leppert, et al., Rozpoznanie i leczenie bólu neuropatycznego: przegląd piśmiennictwa i zalecenia Polskiego Towarzystwa Badania Bólu i Towarzystwa Neurologicznego-część pierwsza, *Ból*. 15 (2014) 8–18.
- [34] N.B. Finnerup, M. Otto, H.J. McQuay, T.S. Jensen, S.H. Sindrup, Algorithm for neuropathic pain treatment: An evidence based proposal, *Pain*. 118 (2005) 289–305.
- [35] J. Wordliczek, R. Zajączkowska, J. Dobrogowski, Farmakologiczne leczenie bólu neuropatycznego, *Pol. Przegląd Neurol.* 7 (2011) 39–48.
- [36] A.M. Waszkielewicz, A. Gunia, S. Karolina, H. Marona, Evaluation of anticonvulsants for possible use in neuropathic pain, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 4344–4358.
- [37] M.A. Rogawski, Molecular targets versus models for new antiepileptic drug discovery, *Epilepsy Res.* 68 (2006) 22–28.
- [38] I.M. Kapetanovic, Computer-Aided Drug Discovery and Development (CADD): in silico-chemico-biological approach, *Chem. Interact.* 171 (2008) 165–176.
- [39] S. Pirhadi, F. Shiri, J.B. Ghasemi, Methods and applications of structure based

- pharmacophores in drug discovery, *Curr. Top. Med. Chem.* 13 (2013) 1036–1047.
- [40] J.D. Guzman, Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity, *Molecules*. 19 (2014) 19292–19349.
- [41] M. Sova, Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives, *Mini Rev. Med. Chem.* 12 (2012) 749–767.
- [42] P. Sharma, Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities, *J. Chem. Pharm. Res.* 3 (2011) 403–423.
- [43] P. De, M. Baltas, F. Bedos-Belval, Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1672–1703.
- [44] V. Nesterenko, K. S. Putt, P. J. Hergenrother, Identification from a combinatorial library of a small molecule that selectively induces apoptosis in cancer cells, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 14672–14673.
- [45] U. Das, H.N. Pati, A.K. Panda, E. De Clercq, J. Balzarini, J. Molnár, et al., 2-(3-Aryl-2-propenoyl)-3-methylquinoxaline-1,4-dioxides: A novel cluster of tumor-specific cytotoxins which reverse multidrug resistance, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 3909–3915.
- [46] A. Jitareanu, G. Tataringa, A. Zbancioc, C. Tuchilus, M. Balan, U. Stanescu, Cinnamic acid derivatives and 4-aminoantipyrine amides - synthesis and evaluation of biological properties, *Res. J. Chem. Sci.* 3 (2013) 9–13.
- [47] Y. Xiao, X. Yang, B. Li, H. Yuan, S. Wan, Y. Xu, et al., Design, synthesis and antifungal/insecticidal evaluation of novel cinnamide derivatives, *Molecules*. 16 (2011) 8945–8957.
- [48] F. Bisogno, L. Mascoti, C. Sanchez, F. Garibotto, F. Giannini, M. Kurina-Sanz, et al., Structure-antifungal activity relationship of cinnamic acid derivatives, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 10635–10640.
- [49] P. De, D. Veau, F. Bedos-Belval, S. Chassaing, M. Baltas, Cinnamic derivatives in tuberculosis, understanding tuberculosis - new approaches to fighting against drug resistance, in: P.J. Cardona (Ed.), *InTech*, available from: <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis-new-approaches-to-fighting-against-drugresistance/cinnamic-derivatives-in-tuberculosis>, 2012.
- [50] N.C. Wheatley, K.T. Andrews, T.L. Tran, A.J. Lucke, R.C. Reid, D.P. Fairlie, Antimalarial histone deacetylase inhibitors containing cinnamate or NSAID components, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 7080–7084.
- [51] G.M. Dobrikov, V. Valcheva, M. Stoilova-Disheva, G. Momekov, P. Tzvetkova, A. Chimov, et al., Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of compounds derived from (R)- and (S)-2-amino-1-butanol - The crucial role of the configuration, *Eur. J. Med. Chem.* 48 (2012) 45–56.
- [52] A. Gaspar, E.M. Garrido, M. Esteves, E. Quezada, N. Milhazes, J. Garrido, et al., New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic acids: Synthesis and physicochemical characterization of novel halogenated derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 2092–2099.
- [53] S. Lee, J. Han, H. Kim, E. Kim, T. Jeong, W. Lee, et al., Synthesis of cinnamic acid derivatives and their inhibitory effects on LDL-oxidation, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 and -2 activity, and decrease of HDL-particle size, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 4677–4681.
- [54] J.Y. Lim, K. Ishiguro, I. Kubo, Tyrosinase inhibitory p-coumaric acid from ginseng leaves, *Phyther. Res.* 13 (1999) 371–375.
- [55] Z. Shi, N. Li, Q. Shi, H. Tang, Y. Tang, Design, synthesis, and preliminary evaluation of substituted cinnamic acid esters as selective matrix metalloproteinase inhibitors,

- Drug Dev Res. 73 (2012) 317–324.
- [56] A. Gunia-Krzyżak, K. Słoczyńska, J. Popiół, P. Koczurkiewicz, H. Marona, E. Pękala, Cinnamic acid derivatives in cosmetics: current use and future prospects, *Int. J. Cosmet. Sci.* 40 (2018) 356–366.
- [57] R.L. Li, S.Y. Wang, Chemical modification and structure-activity relationship studies of piperine and its analogs: an example of drug development from folk medicine, in: T. Fujita (Ed.), *QSAR and Drug Design: New Developments and Applications*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1995: pp. 321–339.
- [58] G. Kluger, B. Bauer, Role of rufinamide in the management of Lennox-Gastaut syndrome (childhood epileptic encephalopathy), *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 3 (2007) 3–11.
- [59] E. Perucca, J. French, M. Bialer, Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances, *Lancet Neurol.* 6 (2007) 793–804.
- [60] H.S. White, K.S. Woodhead, J.P. Wilcox, J.P. Stables, H.J. Kupferberg, H.H. Wolf, Discovery and preclinical development of antiepileptic drugs, in: R.H. Levy, R.H. Mattson, B.S. Meldrum, E. Perucca (Eds.), *Antiepileptic Drugs Fifth Ed.*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: pp. 36–48.
- [61] M.E. Barton, B.D. Klein, H.H. Wolf, H.S. White, Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy, *Epilepsy Res.* 47 (2001) 217–227.
- [62] N.M. Rowley, H.S. White, Comparative anticonvulsant efficacy in the corneal kindled mouse model of partial epilepsy: Correlation with other seizure and epilepsy models, *Epilepsy Res.* 92 (2010) 163–169.
- [63] H.N. Khan, S. Kulsoom, H. Rashid, Ligand based pharmacophore model development for the identification of novel antiepileptic compound, *Epilepsy Res.* 98 (2012) 62–71.
- [64] W. Löscher, Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs, *Seizure.* 20 (2011) 359–368.
- [65] C.H. Large, D.M. Sokal, A. Nehlig, M.J. Gunthorpe, R. Sankar, C.S. Crean, et al., The spectrum of anticonvulsant efficacy of retigabine (ezogabine) in animal models: implications for clinical use, *Epilepsia.* 53 (2012) 425–436.
- [66] B.F.D. Bourgeois, Valproic acid. Clinical efficacy and use in epilepsy, in: R.H. Levy, R.H. Mattson, B.S. Meldrum, E. Perucca (Eds.), *Antiepileptic Drugs Fifth Ed.*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: pp. 808–817.
- [67] W. Löscher, Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy, *CNS Drugs.* 16 (2002) 669–694.
- [68] P. Loiseau, Carbamazepine. Clinical efficacy and use in epilepsy, in: R.H. Levy, R.H. Mattson, B.S. Meldrum, E. Perucca (Eds.), *Antiepileptic Drugs Fifth Ed.*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: pp. 263–277.
- [69] M.A. Rogawski, W. Löscher, The neurobiology of antiepileptic drugs, *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004) 553–564.
- [70] N.M. Rowley, H.S. White, Comparative anticonvulsant efficacy in the corneal kindled mouse model of partial epilepsy: Correlation with other seizure and epilepsy models, *Epilepsy Res.* 92 (2010) 163–169.
- [71] K.H. Stables JP, The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) program: preclinical anticonvulsant screening project, in: M. Avanzini, G. Tanganelli, P. Avoli (Ed.), *Mol. Cell. Targets Antiepileptic Drugs*, John Libbey & Comp. Ltd, London, 1997: pp. 191–198.
- [72] A.K. Srivastava, H.S. White, Carbamazepine, but not valproate, displays pharmacoresistance in lamotrigine-resistant amygdala kindled rats, *Epilepsy Res.* 104

- (2013) 26–34.
- [73] G. Holmes, Animal model studies application to human patients, *Neurology*. 69 (2007) S28-32.

Agnieszka Bucińska-Krzyżak