

**AUTOREFERAT**

**OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

**dr n. med. Urszula Doboszewska**

**2023 r.**

## Spis treści

1. Imię i nazwisko .....	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	4
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych. ....	5
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....	6
4.1. Tytuł osiągnięcia .....	6
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia .....	6
4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników .....	10
4.3.1. Wprowadzenie .....	10
4.3.2. Cel badań.....	15
4.3.3. Wyniki.....	16
4.3.4. Podsumowanie i wnioski .....	34
4.3.5. Piśmiennictwo .....	36
4.4. Inne osiągnięcie.....	41
4.5. Pozostałe kierunki badań .....	42
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej. ....	50
5.1. University of Strathclyde .....	50
5.2. Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk.....	50
5.3. Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie .....	53
5.4. Uniwersytet Jagielloński Collegium-Medicum .....	59
5.5. King's College London .....	59
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę. ....	61
6.1. Działalność dydaktyczna:.....	61
6.2. Działalność popularyzująca naukę: .....	61
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.....	62
7.1. Nagrody międzynarodowe: .....	62
7.2. Nagrody krajowe: .....	62
7.3. Stypendia konferencyjne przyznane przez międzynarodowe towarzystwa naukowe:.....	62

7.4. Stypendia przyznane w celu pobytu w zagranicznych ośrodkach badawczych:.....	63
7.5. Inne przyznana stypendia:.....	64

1. Imię i nazwisko

Urszula Doboszevska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**12.05.2015** – doktor nauk medycznych, biologia medyczna, Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk

Praca doktorska wykonana w Instytucie Farmakologii Polskiej Akademii Nauk i na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, na temat: „Ocena neurobiologiczna i farmakologiczna deficytu cynku jako modelu depresji”. Promotorzy: Prof. dr hab. Gabriel Nowak (Instytut Farmakologii PAN) i Prof. dr hab. Wojciech Piekoszevski (Wydział Chemii UJ).

Praca doktorska zrealizowana w ramach projektu Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie "Nauki Molekularne dla Medycyny", współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego – Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007 – 2013, koordynowanego przez Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni Polskiej Akademii Nauk im. Jerzego Habera.

**31.03.2010** – magister farmacji, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Praca magisterska na temat: „Wpływ cynku w teście pływania na receptory glutamatergiczne” wykonana w Katedrze Farmakobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Promotor: Prof. dr hab. Gabriel Nowak

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

**01.04.2022 – 30.06.2023:** Uniwersytet Jagielloński Collegium-Medicum w Krakowie, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Farmakobiologii, wykonawca w projekcie OPUS z Narodowego Centrum Nauki

**01.03.2020 – 28.02.2022:** Uniwersytet Jagielloński Collegium-Medicum w Krakowie, Wydział Farmaceutyczny, Katedra Farmakobiologii, asystent, stanowisko *post-doc* w projekcie OPUS Narodowego Centrum Nauki

**01.12.2016 – 31.11.2019:** Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Katedra Fizjologii Zwierząt i Farmakologii, adiunkt, kierownik projektu, laureat konkursu FUGA Narodowego Centrum Nauki na staże podoktorskie, opiekun stażu: Prof. dr hab. Piotr Wlaź

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

#### 4.1. Tytuł osiągnięcia

Przedstawione osiągnięcie naukowe stanowi cykl powiązanych tematycznie czterech artykułów naukowych: jednej pracy przeglądowej i trzech artykułów oryginalnych (w tym jednego artykułu wraz z suplementem), opublikowanych w latach 2019-2023, pt.:

##### **Rola receptora GPR39 w zaburzeniach drgawkowych.**

Wyniki badań przedstawione w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia uzyskano podczas kierowania projektem, na który uzyskano finansowanie w ramach konkursu Fuga 5 Narodowego Centrum Nauki, pt.:

##### **Rola receptora GPR39 w zaburzeniach drgawkowych (2016/20/S/NZ7/00424).**

#### 4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia

Praca przeglądowa:

##### **Publikacja 1 (P1)**

**Doboszevska U\***, Młyniec K, Właż A, Poleszak E, Nowak G, Właż P. Zinc signaling and epilepsy. *Pharmacol Ther.* 2019;193:156-177. Wydawnictwo Elsevier. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.08.013. MNiSW<sub>2019</sub>=200, IF<sub>2019</sub>=10,557

Indywidualny wkład w **P1**: *jestem autorem koncepcji artykułu. Napisałam następujące rozdziały: Introduction, Zinc physiology and homeostasis in the brain, Zinc levels following seizures, Possible mechanisms mediating a role for zinc in seizures/epilepsy, The effects of anti-seizure treatment on zinc levels, The effects of zinc administration in epilepsy, Zinc deficient diet and epilepsy, Zinc homeostasis regulating proteins and epilepsy, Summary and conclusions. Jestem autorem*

*koncepcji rycin i opracowałam je we współpracy z firmą zajmującą się grafiką. Opracowałam odpowiedzi do uwag recenzentów, a także poprawiłam manuskrypt zgodnie z tymi uwagami. Jestem autorem korespondencyjnym pracy.*

### Prace oryginalne:

#### **Publikacja 2 (P2)**

**Doboszevska U\***, Socala K, Pieróg M, Nieoczym D, Sawicki J, Szafarz M, Gawel K, Rafało-Ulińska A, Sajnóg A, Wyska E, Esguerra CV, Szewczyk B, Maćkowiak M, Barańkiewicz D, Młyniec K, Nowak G, Sowa I, Wlaż, P. TC-G 1008 facilitates epileptogenesis by acting selectively at the GPR39 receptor but non-selectively activates CREB in the hippocampus of pentylenetetrazole-kindled mice. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2023;80(5):133. Wydawnictwo Springer. doi: [10.1007/s00018-023-04766-z](https://doi.org/10.1007/s00018-023-04766-z). MEiN<sub>2023</sub>=140, IF<sub>2022</sub>=8,0 (w chwili składania wniosku habilitacyjnego brak danych dotyczących IF<sub>2023</sub>)

Indywidualny wkład w **P2**: *jestem twórcą hipotezy badawczej i pomysłodawcą wszystkich wykonanych doświadczeń. Doświadczenia te w dużej mierze zostały sfinansowane w ramach projektu, na który uzyskałam finansowanie z Narodowego Centrum Nauki (2016/20/S/NZ7/00424 NCN). Jestem autorem wniosków do Lokalnej Komisji Etycznej, które umożliwiły wykonanie doświadczeń na zwierzętach niemodyfikowanych genetycznie i modyfikowanych genetycznie (Gpr39 knockout). Współpracowałam także z dr Olgą Gewartowską (pod kierownictwem Prof. Andrzeja Dziembowskiego) z [crispr mice.eu](http://crispr mice.eu) w kwestii uzyskania zgody Lokalnej Komisji Etycznej na wyprowadzenie modelu Gpr39 knockout w mieszanym tle genetycznym. Uczestniczyłam w wykonywaniu modeli drgawek i padaczki u zwierząt niemodyfikowanych genetycznie i Gpr39 knockout, ocenie drgawek behawioralnych oraz w pozyskiwaniu tkanek do dalszych analiz biochemicznych. Wykonałam samodzielnie doświadczenia metodą Western blot i barwienia fluorescencyjne przy użyciu sondy Zinpyr-1. Wykonałam analizy w celu ilościowej oceny wyników uzyskanych ww. metodami. Dokonałam analizy statystycznej wszystkich uzyskanych wyników, zarówno behawioralnych jak i biochemicznych. Przygotowałam wszystkie figury przedstawione w manuskrypcie i suplementach, a także grafiki (te ostatnie przy użyciu programu [biorender.com](http://biorender.com)). Dokonałam interpretacji uzyskanych wyników.*

*Sformułowalam wnioski. Napisałam manuskrypt i suplement. Opracowałam odpowiedzi do uwag recenzentów, a także poprawiałam manuskrypt i suplement na każdym etapie recenzji pracy. Jestem autorem korespondencyjnym pracy.*

### **Publikacja 3 (P3)**

**Doboszevska U\***, Socala K, Pieróg M, Nieoczym D, Sawicki J, Sajnog A, Szewczyk B, Mlyniec K, Sowa I, Baralkiewicz D, Wlaz P. Dietary Zinc Differentially Regulates the Effects of the GPR39 Receptor Agonist, TC-G 1008, in the Maximal Electroshock Seizure Test and Pentylentetrazole-Kindling Model of Epilepsy. Wydawnictwo MDPI. *Cells*. 2023;12(2):264. doi: [10.3390/cells12020264](https://doi.org/10.3390/cells12020264). MEiN<sub>2023</sub>=140, IF<sub>2022</sub>=6,0 (w chwili składania wniosku habilitacyjnego brak danych dotyczących IF<sub>2023</sub>)

Indywidualny wkład w **P3**: *jestem twórcą hipotezy badawczej i pomysłodawcą wszystkich wykonanych doświadczeń. Doświadczenia te w dużej mierze zostały sfinansowane w ramach projektu, na który uzyskałam finansowanie z Narodowego Centrum Nauki (2016/20/S/NZ7/00424 NCN). Jestem autorem wniosków do Lokalnej Komisji Etycznej, które umożliwiły wykonanie doświadczeń na zwierzętach. Uczestniczyłam w wykonywaniu modeli drgawek i padaczki u zwierząt oraz w pozyskiwaniu tkanek do dalszych analiz biochemicznych. Wykonałam samodzielnie wszystkie doświadczenia metodą Western blot. Wykonałam analizy w celu ilościowej oceny wyników uzyskanych tą metodą. Dokonałam analizy statystycznej wszystkich uzyskanych wyników, zarówno behawioralnych jak i biochemicznych. Przygotowałam figury przedstawione w manuskrypcie. Dokonałam interpretacji uzyskanych wyników. Sformułowalam wnioski. Napisałam manuskrypt. Opracowałam odpowiedzi do uwag recenzentów, a także poprawiałam manuskrypt na etapie recenzji pracy. Jestem autorem korespondencyjnym pracy.*

### **Publikacja 4 (P4)**

**Doboszevska U\***, Sawicki J, Sajnog A, Szopa A, Serefko A, Socala K, Pieróg M, Nieoczym D, Mlyniec K, Nowak G, Baralkiewicz D, Sowa I, Wlaz P. Alterations of Serum Magnesium Concentration in Animal Models of Seizures and Epilepsy-The Effects of Treatment with a GPR39 Agonist and Knockout of the *Gpr39* Gene.



Wydawnictwo MDPI. *Cells*. 2022;11(13):1987. doi: [10.3390/cells11131987](https://doi.org/10.3390/cells11131987).  
MEiN<sub>2022</sub>=140, IF<sub>2022</sub>=6,0

Indywidualny wkład w **P4**: *jestem twórcą hipotezy badawczej i pomysłodawcą wszystkich wykonanych doświadczeń. Doświadczenia te w dużej mierze zostały sfinansowane w ramach projektu, na który uzyskałam finansowanie z Narodowego Centrum Nauki (2016/20/S/NZ7/00424 NCN). Wykonałam doświadczenia metodą Western blot i analizę danych uzyskanych przy pomocy tej metody. Dokonałam analizy statystycznej uzyskanych wyników. Przygotowałam figury przedstawione w manuskrypcie. Dokonałam interpretacji otrzymanych wyników. Sformułowałam wnioski. Napisałam manuskrypt. Opracowałam odpowiedzi do uwag recenzentów, a także poprawiłam manuskrypt na etapie recenzji pracy. Jestem autorem korespondencyjnym artykułu.*

\* - autor korespondencyjny (jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym wszystkich prac wchodzących w skład osiągnięcia)

**Sumaryczny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* (IF) ww. artykułów**  
IF<sub>2019/2022</sub>=30,557

**Łączna punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) ww. artykułów zgodnie z rokiem opublikowania – 620**

**Liczba cytowań ww. publikacji wg bazy *Web of Science* (bez autocytowań) na dzień 11.09.2023: 37 (35 P1, 0 P2, 0 P3, 2 P4)**

**Liczba cytowań wg bazy *Google Scholar* (bez autocytowań) na dzień 11.09.2023: 52 (47 P1, 0 P2, 1 P3, 4 P4)**

### 4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

#### 4.3.1. Wprowadzenie

Badania, które prowadzę, dotyczą udziału receptorów związanych z białkami G (ang. *G-protein coupled receptors*, GPCRs) w powstawaniu i leczeniu chorób mózgu: padaczki i depresji. Obie te choroby dotyczą miliony ludzi na świecie (Ngugi i wsp., 2010), ich neurobiologia jest złożona i nie do końca poznana (Galanopoulou i wsp., 2012; Jauhar i wsp., 2023; Moncrieff i wsp., 2022), a u ponad 30% pacjentów nie udaje się osiągnąć satysfakcjonujących efektów terapii przy pomocy obecnie dostępnych środków farmakologicznych (Dalic i Cook, 2016; Trivedi i wsp., 2006).

GPCRs stanowią największą grupę receptorów błonowych i największą grupę białek stanowiących punkt uchwytu dla leków (Hauser i wsp., 2017; Hauser i wsp., 2018; Sriram i Insel, 2018). Współczesne leki wpływają jednak tylko na niewielką liczbę spośród zsekwencjonowanych GPCRs, a potencjał opracowania nowych leków działających poprzez tę nadrodzinę receptorów jest duży.

Szansą na opracowanie leków o nowych mechanizmach działania (działających poprzez nowe cele molekularne), które mogą pomóc zaspokoić aktualne potrzeby medyczne, jest badanie tzw. receptorów sierocych (Watkins i Orlandi 2021; Yang i in. 2021). Są to receptory, dla których dane dotyczące endogennych (występujących naturalnie w organizmie) ligandów – agonistów (substancji wiążących się do receptora i aktywujących receptor) i/lub funkcji są ograniczone.

Przedmiotem badań przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia był GPR39. Zgodnie z oficjalnym stanowiskiem międzynarodowych towarzystw farmakologicznych jest on wciąż receptorem sierocym (Alexander i wsp., 2020). Proponowana klasyfikacja jako receptora dla jonów cynku ( $Zn^{2+}$ ), pozostaje wciąż kwestią nierozstrzygniętą.

Jako stosunkowo słabo poznany receptor należący do nadrodziny GPCRs, GPR39 przyciąga uwagę przemysłu farmaceutycznego i środowiska akademickiego. Zainteresowanie GPR39 znajduje odzwierciedlenie w liczbie publikacji, które w ostatnim czasie ukazały się w renomowanych czasopismach (m.in. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (Meda Venkata i wsp., 2023), *Blood* (Iovino i wsp., 2022)), a także rosnącej liczbie zgłoszeń patentowych (Kaul i wsp., 2021).

Receptor ten jest badany w odniesieniu do chorób układu krążenia (Liao i wsp., 2021; Methner i wsp., 2021), chorób naczyń mózgowych (Davis i wsp., 2021), chorób mózgu, takich jak depresja (Mlyniec i wsp., 2014) lub padaczka (publikacje **P2-P4**), chorób naczyń obwodowych związanych z cukrzycą (Meda Venkata i wsp., 2023), czy limfopenii związanej z przeszczepem hematopoetycznych komórek macierzystych (Iovino i wsp., 2022). Analiza literatury patentowej wskazuje na zainteresowanie GPR39 także pod kątem możliwości leczenia nadciśnienia (Kaul i wsp., 2021). W badaniach klinicznych w onkologii znajdują się leki, które wcześniej opisywane były jako selektywne inhibitory kinaz (LY2784544 (gantotinib), GSK2636771), a które okazały się być agonistami GPR39 (Sato i wsp., 2016). Wiedza na temat funkcji tego receptora jest więc istotna dla kierunku przyszłych badań (np. programów mających na celu opracowanie leków będących agonistami bądź antagonistami GPR39) oraz z perspektywy bezpieczeństwa terapii kandydatami na leki znajdującymi się już w fazie badań klinicznych, nie wspominając o postępie w dziedzinie nauk podstawowych.

Dane dotyczące GPR39 są jednak kontrowersyjne i uniemożliwiają jego pełną walidację jako nowego celu terapii. Nie tylko endogenne ligandy GPR39 budzą dyskusje, ale także ligand syntetyczny, szeroko wykorzystywany jako narzędzie modelowe służące do badania funkcji receptora (artykuł w recenzji, na zaproszenie z czasopisma *Drug Discovery Today*). TC-G 1008 jest określany jako selektywny agonista GPR39 (Peukert i wsp., 2014), ([https://www.tocris.com/products/tc-g-1008\\_5355](https://www.tocris.com/products/tc-g-1008_5355)), mimo faktu, że może się on również wiązać z receptorem serotoninowym 5-HT<sub>1A</sub> (Sato i wsp., 2016). Doświadczenia wykonane w ramach niniejszego cyklu artykułów miały na celu przybliżenie funkcji GPR39 i charakterystykę TC-G 1008.

### GPR39 na tle (sierocych) GPCRs – proponowane endogenne ligandy

W ludzkim genomie zidentyfikowano ponad 800 sekwencji GPCRs (Fredriksson i wsp., 2003). Mimo poznania sekwencji, ligandy aktywujące wiele przewidywanych receptorów nie były znane, ani też mechanizmy ich sygnalizacji. Zostały one określone mianem „receptorów sierocych” (ang. *orphan receptors*).

Największa klasa GPCRs (klasa A wg. klasyfikacji A-F (Kolakowski, Jr., 1994), odpowiadająca rodzinie rodopsyn systemu GRAFS) (Fredriksson i wsp., 2003)

obejmuje 719 receptorów, z których 197 ma znany ligand endogenny, a 87 to receptory sieroce. Spośród 87 sierocych GPCRs klasy A, endogenny ligand został zaproponowany dla 54 w co najmniej jednej publikacji. GPR39 znajduje się wśród nich (Alexander i wsp., 2019).

Ponad 100 GPCRs to cele molekularne dla około 35% wszystkich leków zarejestrowanych przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *U.S. Food and Drug Administration*). GPCRs stanowią 12% celów dla leków, a tym samym reprezentują największą grupę białek, poprzez które działają środki farmakologiczne stosowane w leczeniu (Hauser i wsp., 2017; Hauser i wsp., 2018; Sriram i Insel, 2018).

W stosunku do całkowitej liczby zsekwencjonowanych GPCRs (około 800), współczesne leki wpływają tylko na niewielką ich liczbę (około 100) (Alexander i wsp., 2019). GPCRs są pożądanymi celami dla nowych cząsteczek o działaniu terapeutycznym ze względu na swoją strukturę oraz fakt, że uruchamiają one kaskady sygnalizacji wewnątrzkomórkowej pośredniczące we wszystkich znanych funkcjach fizjologicznych (Wacker i wsp., 2017). Przewiduje się, że liczba leków działających poprzez GPCRs, włączając receptory sieroce, wzrośnie (Dershem i wsp., 2019; Freudenberg i wsp., 2018). Co istotne, lek działający poprzez receptor sierocy może zostać dopuszczony do leczenia zanim receptor zostanie sparowany z endogennym ligandem, na podstawie wykazania roli receptora w patofizjologii choroby oraz następujących po tym badań przedklinicznych i klinicznych (np. rejestracja w 2023 r. preparatu Talvey (talquetamab) przez firmę Janssen, działającego poprzez receptor sierocy GPRC5D, którego zwiększoną ekspresję obserwuje się w szpiku kostnym w przebiegu szpiczaka mnogiego: <https://www.jnj.com/u-s-fda-approves-talvey-talquetamab-tgvs-a-first-in-class-bispecific-therapy-for-the-treatment-of-patients-with-heavily-pretreated-multiple-myeloma>).

Endogennymi ligandami GPCRs są cząsteczki zróżnicowane pod względem fizykochemicznym, począwszy od małych cząsteczek, przez peptydy, do dużych białek (Alexander i wsp., 2019). Istnieją też ligandy będące protonami, jonami, czy pochodnymi kwasów tłuszczowych (Wacker i wsp., 2017). W odniesieniu do GPR39, pierwszym zaproponowanym endogennym ligandem – agonistą, był peptyd obestatyna. Doniesienie na ten temat ukazało się w czasopiśmie *Science* (Zhang i wsp., 2005). Kolejnym grupom badawczym nie udało się powtórzyć tych

wyników (Chartrel i wsp., 2007; Holst i wsp., 2007; Lauwers i wsp., 2006), co doprowadziło do odrzucenia hipotezy o obestatyinie jako endogennym agonistcie GPR39.

Następnie wykazano, że jony cynku aktywują receptor (Holst i wsp., 2007; Yasuda i wsp., 2007). Dowód na to, że jony cynku pochodzące z przestrzeni zewnątrzkomórkowej stymulują uwalnianie jonów wapnia w przestrzeni wewnątrzkomórkowej poprzez szlak fosfolipazy C/inozytolotrójfosforanu (PLC/IP3), został opublikowany już w 2001 roku (Hershinkel i wsp., 2001). Te obserwacje wskazały na istnienie receptora dla cynku na powierzchni komórek. Receptor zaproponowany przez zespół Hershinkel i wsp. (2001) został najpierw nazwany analogicznie do GPCR dla jonów wapnia, a w toku dalszych badań zidentyfikowany jako GPR39 (Besser i wsp., 2009).

Do dziś nie jest jednak jasne, czy cynk jest rzeczywistym agonistą GPR39, czy pozytywnym modulatorem allosterycznym, tak jak w przypadku innych GPCRs (np. receptorów: serotoninowych 5-HT<sub>1A</sub>, dopaminowych D2 czy galaninowych typu 1). Wątpliwości budzi również fakt, czy fizjologiczne stężenia cynku są wystarczające, aby aktywować receptor ((Maret, 2001), artykuł w recenzji *Drug Discovery Today*). Wykazanie, że proponowany ligand endogenny jest obecny w tkankach, w których zachodzi ekspresja receptora, w stężeniu wystarczającym do wywołania efektu i/lub istnieją mechanizmy syntezy i/lub transportu odpowiedzialne za osiągnięcie takiego stężenia w miejscu docelowym, jest jednym z kryteriów parowania receptor-ligand w procesie zwanym w j. ang. „*deorphanization*” (Davenport i wsp., 2013).

W ostatnim czasie pojawiło się doniesienie, że GPR39 jest receptorem dla jeszcze innej klasy mediatorów, eikozanoidów: kwasu 15-hydroksyeikozatetraenowego (15-HETE) i kwasu 14,15-epoksyekozatrienowego (14,15-EET), których efekty są modulowane allosterycznie przez cynk (Alkayed i wsp., 2022). Rosnąca liczba doniesień wskazuje, że eikozanoidy wywołują efekty poprzez GPCRs (Wang i wsp., 2021). Potwierdzenie obserwacji dotyczących eikozanoidów jako agonistów/antagonistów GPR39 sprawi, że będzie on kolejnym GPCR zidentyfikowanym jako receptor dla cząsteczek kwasów hydroksyeikozatetraenowych (HETEs). Innym takim receptorem jest GPR75, poprzez który zachodzi sygnalizacja 20-HETE (Garcia i wsp., 2017). Do tej pory nie zostało jednak zbadane czy aktywacja przez ligandy eikozanoidowe umożliwi

wyjaśnienie opisanych wcześniej efektów GPR39 (Doboszevska i wsp., 2023). Kwestia endogennych ligandów GPR39 pozostaje więc otwarta.

### Syntetyczne ligandy GPR39

W sytuacji nieznanego liganda endogennego, narzędziami do badania funkcji receptora są ligandy syntetyczne i techniki biologii molekularnej/inżynierii genetycznej. Umożliwiają one wykazanie funkcji receptora i jego istotności dla danego stanu patofizjologicznego, a także potencjalnej roli w terapii tego stanu.

Postęp w poznaniu funkcji GPR39 był początkowo ograniczony przez brak modelowych narzędzi farmakologicznych. TC-G 1008 był jednym z pierwszych małowiązących ligandów syntetycznych - agonistów GPR39 wprowadzonych na rynek (Peukert i wsp., 2014). Mimo, że od tego czasu opracowano także inne syntetyczne ligandy małowiązące (Fjellstrom i wsp., 2015; Frimurer i wsp., 2017), do chwili obecnej jest on najczęściej stosowany do badania funkcji receptora (artykuł w recenzji *Drug Discovery Today*). Związek ten był początkowo przedstawiany jako selektywny (Peukert i wsp., 2014), jednak dalsze prace wykazały, że może on się również wiązać z receptorem serotoninowym 5HT<sub>1A</sub> (Sato i wsp., 2016). Mimo tego, naukowcy wykorzystywali TC-G 1008 do badania funkcji GPR39, ale nie weryfikowali obserwacji poczynionych w ten sposób u zwierząt pozbawionych genu kodującego receptor (ang. *Gpr39 knockout*), ani też nie dyskutowali innych mechanizmów przez które cząsteczka TC-G 1008 może działać (artykuł w recenzji *Drug Discovery Today*). Te okoliczności były przesłanką do badania selektywności TC-G 1008 w cyklu prac stanowiących podstawę niniejszego wniosku.

### GPR39 jako cel terapeutyczny w padaczce

Wcześniejsze badania, w których uczestniczyłam dotyczyły roli GPR39 w patofizjologii depresji. Zaobserwowano w nich między innymi zmiany w ekspresji GPR39 w zwierzęcych modelach depresji (modele usunięcia opuszek węchowych i deficytu cynku) oraz w tkance mózgowej pobranej od osób, które popełniły samobójstwo (Mlyniec i wsp., 2014). Depresja jest jednym z głównych czynników ryzyka samobójstwa (Ribeiro i wsp., 2018). Nasze dane wskazały zatem na istotność GPR39 dla patofizjologii depresji, a w szerszej perspektywie na zasadność badania GPR39 pod kątem chorób neuropsychiatrycznych.

Dane literaturowe przemawiały za podjęciem tematu GPR39 także w kontekście padaczki. Badania *in vitro* wykazały, że GPR39 ma znaczenie dla neuroprzebieżnictwa hamującego (Chorin i wsp., 2011; Gilad i wsp., 2015). Badania *ex vivo* i *in vivo* wskazały na związek między ekspresją/funkcją receptora a drgawkami. Stan padaczkowy (ang. *status epilepticus*, SE), który często poprzedza rozwój choroby, wywołany eksperymentalnie przez chlorek litu-pilokarpinę zmniejszył ekspresję białka GPR39 w hipokampie (Chen i wsp., 2019). Sekwencjonowanie RNA ujawniło up-regulację genu *gpr39* u danio pręgowanego (*Danio rerio*) pozbawionego genu *stim2b*, który cechuje się nadpobudliwością i zwiększoną wrażliwością na drgawki wywołane substancją drgawkotwórczą – pentetrazolem (Wasilewska i wsp., 2020). Myszy *Gpr39 knockout* cechowały się z kolei zwiększoną podatnością na drgawki wywołane pojedynczym dootrzewnowym (*i.p.*) podaniem innej substancji drgawkotwórczej – kwasu kainowego, w porównaniu do myszy dzikich (Gilad i wsp., 2015). Wysłunięto więc hipotezę, że aktywacja GPR39 może stanowić nową strategię farmakologicznego hamowania drgawek (Gilad i wsp., 2015; Khan, 2016). Strategia ta nie była jednak zweryfikowana eksperymentalnie. Ponadto, nie była znana rola GPR39 w procesie rozwoju padaczki, czyli w epileptogenezie (Galanopoulou i wsp., 2012). Na podstawie powyższych obserwacji sformułowano cele badawcze projektu NCN 2016/20/S/NZ7/00424, którego wyniki przedstawiono w pracach eksperymentalnych wchodzących w skład osiągnięcia.

#### 4.3.2. Cel badań

Projekt 2016/20/S/NZ7/00424 miał charakter badania przedklinicznego typu słuszności koncepcji (ang. *proof of concept*). Jego celem było udowodnienie roli GPR39 w patofizjologii padaczki i wykazanie mechanizmu terapeutycznego, który miał posłużyć do tłumienia drgawek/leczenia padaczki. Mechanizmem tym miała być aktywacja GPR39. Cel planowano osiągnąć poprzez:

- wykorzystanie narzędzia modelowego, agonisty GPR39 – TC-G 1008 (farmakologiczna walidacja proponowanego celu molekularnego terapii)
- wykorzystanie myszy pozbawionych genu kodującego GPR39 (poznanie fenotypu *Gpr39 knockout* w odniesieniu do procesu epileptogenezy)

Jako potencjalny mechanizm aktywacji GPR39 w padaczce badano białka szlaku sygnalizacyjnego receptora i pule cynku (cynk całkowity i wolny) (**P2, P3**) lub magnez całkowity (**P4**) w mózgu i/lub surowicy.

#### 4.3.3. Wyniki

**(P1) Doboszevska U**, Młyniec K, Właż A, Poleszak E, Nowak G, Właż P. Zinc signaling and epilepsy. *Pharmacol Ther.* 2019;193:156-177.

Wykonanie doświadczeń opisanych w publikacjach **P2-P4** zostało poprzedzone analizą danych literaturowych dotyczących sygnalizacyjnych funkcji cynku w odniesieniu do padaczki (**P1**).

W organizmach żywych jony cynku występują głównie z połączeniach z białkami, tworząc proteom cynkowy, który pełni funkcje strukturalne i katalityczne. Jednak w przestrzeniach wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej występują także jony niezwiązane z białkami, które są określane jako „wolny cynk” (ang. *free zinc*). Badacze używają zamiennie określeń labilny cynk (ang. *labile zinc*) lub cynk luźno związany (w domyśle z białkami) (ang. *loosely bound zinc*). O ile cynk całkowity można zmierzyć w komórkach lub tkankach przy pomocy metod analitycznych takich jak np. spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ang. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) czy metod pokrewnych, a ponadto metody z wykorzystaniem ablacji laserowej (ang. *laser ablation*, LA) (np. LA-ICP-MS) umożliwiają obrazowanie, a więc analizę rozmieszczenie cynku całkowitego w tkankach, o tyle zmierzenie wolnych jonów cynku w układach biologicznych nastęrcza trudności. Mogą być one badane przy pomocy sond fluorescencyjnych, jednak większość dostępnych sond jest przeznaczona do wykazania obecności wolnych jonów, ale nie do ich oceny ilościowej. Nie ma konsensusu co do stężeń wolnego cynku w surowicy. Próby kwantyfikacji wolnego cynku w surowicy ludzkiej, wykonane przy pomocy sondy fluorescencyjnej Zinpyr-1 wskazały na zakres stężeń pomiędzy 0,09 – 0,42 nM (Alker i wsp., 2019). Podobny rząd wielkości (0,25 nM) został wykazany dla próbek płodowej surowicy bydłcej (ang. *fetal bovine serum*, FBS) przy pomocy metody AGNES (ang. *absence of gradients and Nernstian equilibrium stripping*), podczas gdy cynk całkowity, zmierzony w próbkach FBS przy pomocy ICP-MS wyniósł ok. 45  $\mu$ M (Lopez-Solis i wsp., 2022).



Jeszcze mniej wiadomo na temat stężeń wolnego cynku w mózgu. Skrawki mózgowie pochodzące od myszy pozbawionych genu kodującego transporter ZnT3 nie ulegają barwieniu Timma – klasycznej metodzie barwienia histochemicznego, która opiera się o reakcję jonów metali przejściowych z siarczkiem srebra (Blixhavn i wsp., 2023). Na podstawie tych obserwacji sformułowano wniosek, że cynk wolny jest transportowany do wnętrza pęcherzyków synaptycznych przy pomocy białka ZnT3 (Cole i wsp., 1999). Próby modelowania matematycznego umożliwiły oszacowanie zawartości cynku w pęcherzykach synaptycznych w odniesieniu do ilości neuroprzekaźnika pobudzającego, glutaminianu, w tych pęcherzykach (Vergnani i wsp., 2014), jednak dynamika zmian stężenia cynku w przestrzeni synaptycznej nie została poznana, ani też absolutne wartości stężeń.

Bezspornym jest, że cynk wolny stanowi niewielką część cynku całkowitego, jednak ta mała w stosunku do związanej z białkami pula pełni istotne funkcje sygnalizacyjne. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej sygnalizacja cynkiem zachodzi np. poprzez allosteryczną modulację GPCRs. W przestrzeni wewnątrzkomórkowej, wolny cynk działa jako przekaźnik drugiego rzędu, a więc powoduje zwielokrotnienie informacji przepływających od receptorów czy kanałów jonowych. Cynk może napływać do wnętrza komórek poprzez kanały jonowe, może także modulować ich funkcje, tak jak w przypadku GPCRs. Nadmierna ilość wolnego cynku wewnątrz komórki jest szkodliwa, dlatego precyzyjne mechanizmy homeostazy (m.in. transportery z rodzin ZnT i ZIP oraz metalotioneiny) kontrolują jego stężenia.

W pracy przeglądowej (**P1**) omówiono, jak kształtują się poziomy cynku całkowitego lub wolnego zmierzone/wykazane jakościowo przy pomocy wymienionych wyżej metod (metody spektroskopowe, sondy fluorescencyjne, metoda barwienia Timma) w próbkach biologicznych: osoczu/surowicy lub tkance mózgowej pochodzących od zwierząt doświadczalnych, u których wywołano drgawki lub padaczkę oraz w próbkach klinicznych, pochodzących od pacjentów z padaczką, pobranych przed lub po wdrożeniu leczenia. Uwzględniono także przedkliniczne i kliniczne aspekty związku pomiędzy niedoborem cynku, wywołanego np. dietą a występowaniem drgawek lub rozwojem padaczki.

Opisano mechanizmy homeostazy cynkiem w mózgu i cele molekularne poprzez które zachodzi sygnalizacja cynkiem. Uwagę poświęcono tym mechanizmom działania, które mogą mieć znaczenie dla powstawania i/lub hamowania drgawek i/lub

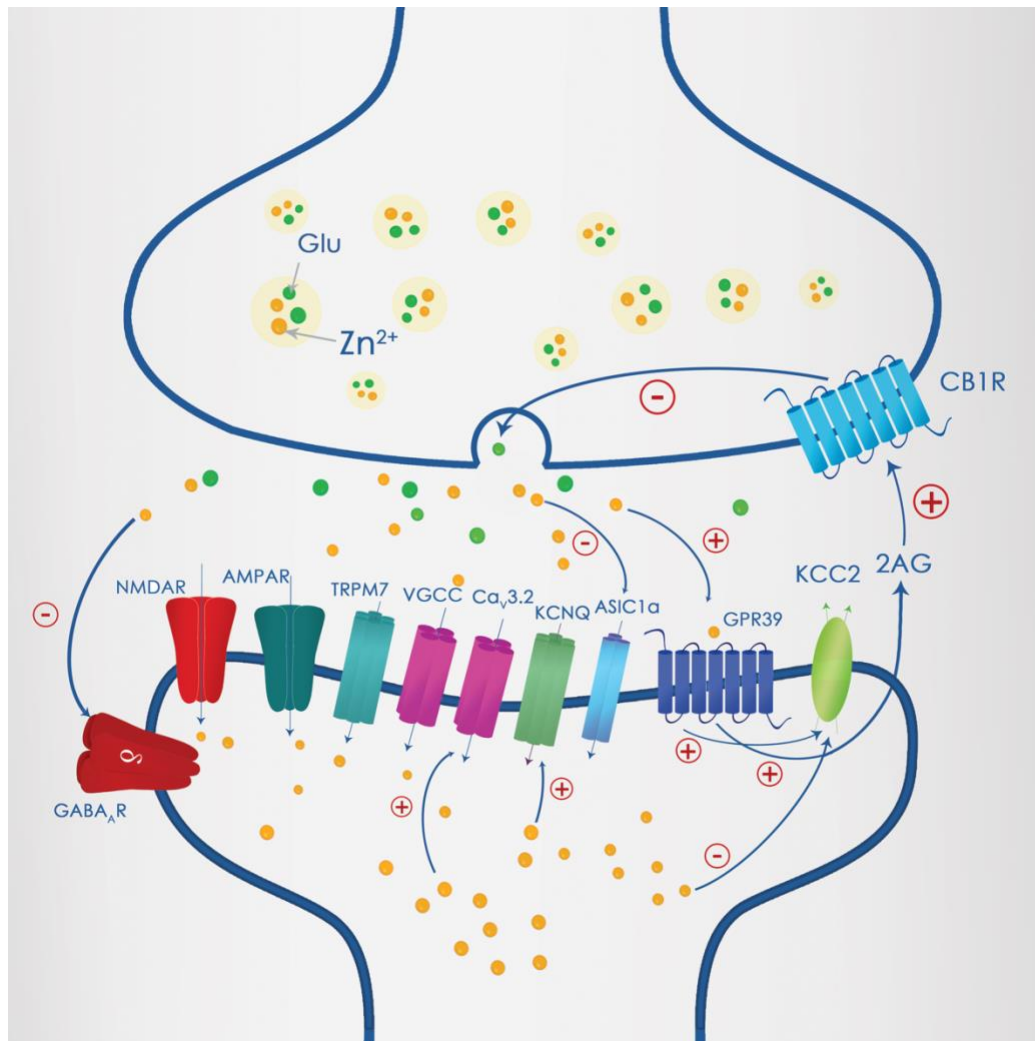
leczenia padaczki. Dlatego przedstawiono interakcje cynku z następującymi celami molekularnymi:

- Receptorami kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) (**NMDAR**)
- Receptorami kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolo-propionowego (AMPA) (**AMPAR**)
- Jonotropowymi receptorami kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) (klasą A) (**GABA<sub>A</sub>R**)
- **GPR39**
- Kanałami wapniowymi bramkowanymi napięciem (ang. *Voltage-gated calcium channels*) (**VGCCs**) (m.in. kanałami **Cav3.2**)
- Kanałami potasowymi bramkowanymi napięciem (podrodziną Q) (ang. *Potassium voltage-gated channel subfamily Q*) (**KCNQ**)
- Kanałami receptora przejściowego potencjału (podrodziną M, 7s) (ang. *Transient receptor potential melastin channel 7s*) (**TRPMs7**)
- Kanałami jonowymi bramkowanymi protonami (ang. *Acid-sensing ion channels*) (**ASICs**)

Celem takiego przedstawienia było nakreślenie związku pomiędzy konsekwencjami zmian poziomów cynku dla sygnalizacji w przestrzeni zewnątrz-lub wewnątrzkomórkowej poprzez wybrane cele molekularne w padaczce.

Z przeglądu piśmiennictwa wykonanego w sposób krytyczny płyną następujące konkluzje:

- Nie wykazano absolutnych stężeń wolnego cynku w mózgu w przestrzeniach wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowej w przebiegu padaczki (stężeń tych nie wykazano nie tylko w warunkach patofizjologicznych, np. w stanie padaczkowym, ale również w warunkach fizjologicznych)
- Niezależnie od powyższego, wykazano zmienione działanie wolnego cynku w stanach patofizjologicznych
- Związek pomiędzy sygnalizacją cynkiem a padaczką jest niewątpliwie złożony, ponieważ zarówno zewnątrzkomórkowy, jak i wewnątrzkomórkowy wolny cynk może wywoływać działanie ochronne lub szkodliwe, czasami działając poprzez ten sam cel molekularny, co schematycznie przedstawiono na **Rycinie 1**.



**Rycina 1. Możliwe działanie zewnątrzkomórkowego i wewnątrzkomórkowego wolnego cynku, prowadzące do nasilenia lub hamowania drgawek (objawu padaczki) lub procesu epileptogenezy (chronicznego procesu rozwoju padaczki).** Drgawki są tradycyjnie rozumiane jako zaburzenie równowagi pomiędzy neuroprzebieżnictwem hamującym a pobudzającym (Staley, 2015). Wolny cynk uczestniczy w modulowaniu hamującego (GABA-ergicznego) i pobudzającego (glutaminianergicznego) neuroprzebieżnictwa. Wolny cynk pochodzący z przestrzeni zewnątrzkomórkowej aktywuje GPR39, prowadząc do zwiększonej aktywności kotransportera chlorkowo-potasowego 2 (ang. *potassium-chloride cotransporter 2*, KCC2), która jest niezbędna dla hamującego neuroprzebieżnictwa GABA-ergicznego. Ponadto, aktywacja GPR39 hamuje uwalnianie neuroprzebieżnika pobudzającego, glutaminianu, poprzez promowanie syntezy 2-arachidonyloglicerolu (ang. *2-arachidonoylglycerol*, 2-AG), agonisty presynaptycznego receptora kannabinoidowego typu 1 (ang. *cannabinoid type 1 receptor*, CB1R). Co więcej, cynk

zwnętrzkomórkowy działa neuroprotekcynie ze względu na hamowanie aktywność kanału ASIC1a. Te trzy mechanizmy działania przemawiają za ochronnym działaniem cynku zwnętrzkomórkowego. Z drugiej strony zwnętrzkomórkowy cynk hamuje ekstrasyneptyczne receptory  $\delta$ -GABAAR, a tym samym znosi mediowanę poprzez neurosteroidy aktywację tonicznego hamowania i zależną od neurosteroidów ochronę przed drgawkami. Ten ostatni mechanizm działania cynku zwnętrzkomórkowego może wręcz przeciwnie potęgować drgawki. Zwnętrzkomórkowy cynk dostaje się do neuronu postsyneptycznego kilkoma drogami: poprzez NMDAR, pozbawione GluA2-(przepuszczalne dla wapnia)-AMPAR, VGCC i TRPM7. Cynk wwnętrzkomórkowy może działać szkodliwie. W przeciwieństwie do wpływu zwnętrzkomórkowego cynku nasilającego aktywność KCC2, wzrost wwnętrzkomórkowego cynku hamuje KCC2. Ponadto wwnętrzkomórkowy cynk może wywoływać drgawki/padaczkę poprzez aktywację kanałów wapniowych typu T Cav3.2. Z drugiej strony wwnętrzkomórkowy cynk może również wywierać ochronne efekty poprzez aktywację kanałów KCNQ. **(P1)**

Wykonana w ramach pracy przeglądowej **P1** analiza umożliwiła sformułowanie następnego wniosku końcowego:

- Potrzebne są badania z pomocą metod genetycznych/ligandów selektywnie działających poprzez cele molekularne związane z homeostazą cynkiem i/lub jego sygnalizacją, aby wykazać, czy działanie poprzez te białka wywoła efekt przeciwdrgawkowy. Ligandy i modele genetyczne powinny być następnie testowane w modelach padaczki, w celu wykazania, czy celowanie w te białka wywoła efekt przeciwpadaczkowy. Takie postępowanie pozwoli wykazać potencjał terapeutyczny celowania w elementy odpowiedzialne za homeostazę cynkiem i/lub jego sygnalizację w leczeniu padaczki.

Zaproponowany powyżej tok postępowania zrealizowano w publikacjach eksperymentalnych **P2-P4** w odniesieniu do GPR39.

Praca przeglądowa **P1** umożliwiła także wybór elementów szlaków sygnalizacyjnych, które były badane w publikacjach **P2-P4**. Jedną z kluczowych publikacji badających zależność między wolnym cynkiem a padaczką jest praca van Loo i wsp. (2015). Przy pomocy sondy fluorescencyjnej przenikającej przez błony komórkowe autorzy wykazali wzrost stężenia wolnego cynku po wywołaniu stanu

padaczkowego u szczurów oraz zwiększenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego MTF1 w hipokampie szczurów. MTF1 jest jednym czynnikiem transkrypcyjnym wrażliwym na wolny cynk – jest on proponowanym sensorem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów cynku. Ponadto analiza ekspresji MTF1 wykazała korelację poziomu tego czynnika z poziomem ekspresji Cav3.2, który również był aktywowany zwiększeniem poziomu cynku wewnątrzkomórkowego. Te ostatnie obserwacje grupy van Loo i wsp. (2015) zostały poczynione w tkance mózgowej pobranej od pacjentów z padaczką lekooporną i stwardnieniem hipokampa (ang. *hippocampal sclerosis*). Te dane skłoniły do przeanalizowania wolnego cynku wewnątrzkomórkowego i MTF1 w publikacji **P2**.

Wykonana w ramach pracy **P1** analiza umożliwiła także wybór metod analitycznych do badania puli cynku (cynk całkowity i wolny) (metody: ICP-OES, LA-ICP-MS, barwienie fluorescencyjne przy pomocy przenikającej przez błony sondy Zinyr-1) w publikacjach **P2-P4**. Praca przeglądowa (**P1**) jest często cytowana pod kątem możliwości opracowania nowych metod detekcji wolnego cynku, co wskazuje, że stanowi ona cenny zbiór danych na ten temat. Spotyka się także z zainteresowaniem opiekunów pacjentów w odniesieniu do roli cynku w padaczce u dzieci.

## **(P2)**

**Doboszevska U**, Socała K, Pieróg M, Nieoczym D, Sawicki J, Szafarz M, Gawel K, Rafało-Ulińska A, Sajnog A, Wyska E, Esguerra CV, Szewczyk B, Maćkowiak M, Barańkiewicz D, Mlyniec K, Nowak G, Sowa I, Wlaź, P. TC-G 1008 facilitates epileptogenesis by acting selectively at the GPR39 receptor but non-selectively activates CREB in the hippocampus of pentylenetetrazole-kindled mice. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2023;80(5):133.

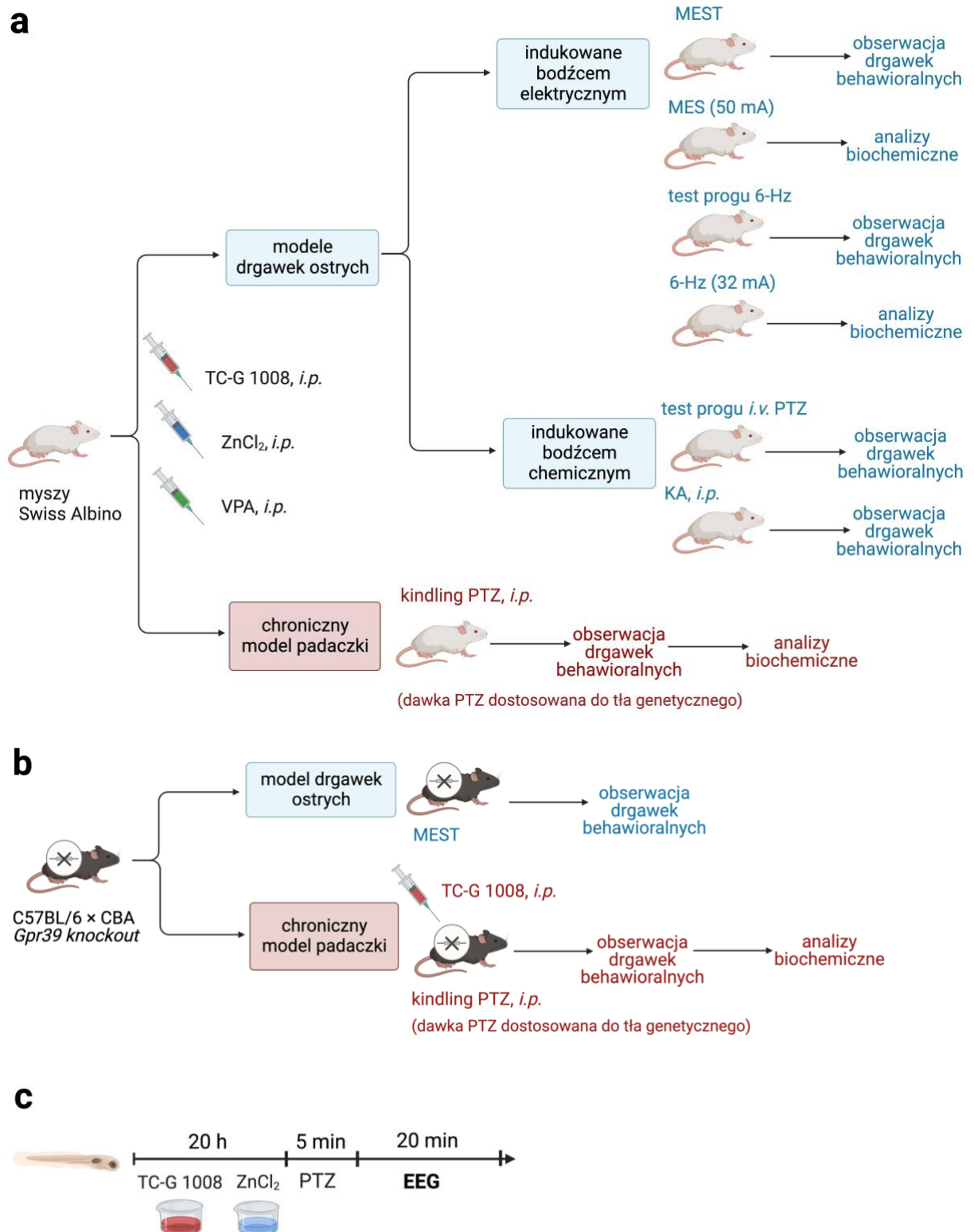
W projekcie 2016/20/S/NZ7/00424 badano rolę receptora GPR39 w patofizjologii padaczki i jej mechanizmach terapeutycznych. Do badań wykorzystano agonistę GPR39, związek TC-G 1008. Wykonano modele drgawek ostrych i padaczki u myszy niemodyfikowanych genetycznie (Swiss Albino) oraz z wykorzystaniem linii myszy z delecją genu *Gpr39*, wyprowadzonej przy pomocy metody CRISPR/Cas9 w mieszanym tle genetycznym (C57BL/6/Tar × CBA/Tar) (model opracowany pod kierownictwem prof. Andrzeja Dziembowskiego przez crispr mice.eu, jednostkę działającą przy Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie). Doświadczenia u myszy Swiss Albino prowadzono w odniesieniu do

nieselektywnego agonisty GPR39, chlorku cynku ( $ZnCl_2$ ) i standardowego leku przeciwdrgawkowego, stosowanego w leczeniu padaczki – kwasu walproinowego (VPA), który stanowił kontrolę pozytywną. W eksperymentach u myszy Swiss Albino i C57BL/6/Tar × CBA/Tar oceniano wpływ badanych związków na drgawki behawioralne.

U myszy Swiss Albino wykonano następujące testy/modele drgawek/padaczki:

- Test progu maksymalnych drgawek elektrycznych (ang. *maximal electroshock seizure threshold test*, MEST)
- Model maksymalnych drgawek elektrycznych (ang. *maximal electroshock seizure*, MES), indukowany prądem o natężeniu 50 mA
- Test progu drgawek indukowanych prądem o częstotliwości 6-Hz
- Model drgawek indukowanych prądem 6-Hz, wywołany poprzez aplikację bodźca o natężeniu 32 mA
- Test progu drgawek wywołanych dożylną (*i.v.*) infuzją pentetrazolu
- Model drgawek wywołanych jednorazową dootrzewnową iniekcją kwasu kainowego
- Chroniczny model padaczki (kindling pentetrazolowy) (inaczej model drgawek rozniecanych), wywołany wielokrotnym podawaniem pentetrazolu *i.p.*

U myszy C57BL/6/Tar × CBA/Tar (dzikich i *Gpr39 knockout*) wykonano test MEST i model kindlingu pentetrazolowego (**Rycina 2**). We wszystkich doświadczeniach behawioralnych uczestniczyła habilitantka i zespół pod kierownictwem Prof. Piotra Wlazia: dr hab. Katarzyna Socala, dr hab. Dorota Nieoczym i dr Mateusz Pieróg.



**Rycina 2. Schemat doświadczeń.** Doświadczenia przeprowadzono z użyciem myszy: Swiss Albino i C57BL/6/Tar × CBA/Tar. W tle genetycznym C57BL/6/Tar × CBA/Tar wprowadzono model *Gpr39 knockout*. Wykorzystano modele drgawek ostrych, indukowanych bodźcami elektrycznymi i chemicznymi oraz chroniczny model

kindlingu pentetrazolowego (PTZ), odzwierciedlający proces epileptogenezy. Oceniano drgawki behawioralne (**a**, **b**). Drgawki elektroencefalograficzne oceniano u *Danio rerio* (**c**) (**P2**, zmodyfikowane).

Oprócz oceny drgawek behawioralnych, oceniono także wpływ TC-G 1008 na czynności bioelektryczną mózgu u larw ryb *Danio rerio*. Doświadczenie to zostało wykonane na Uniwersytecie w Oslo przez dr Kingę Gawęł, pod kierownictwem Prof. Camilli Esguerry.

TC-G 1008 był podawany w wymienionych wyżej doświadczeniach u myszy *i.p.* Celem tych doświadczeń było wykazanie jego działania w odniesieniu do funkcji mózgu. Dlatego badanie działania TC-G 1008 zostało poprzedzone wyznaczeniem jego stężenia w mózgu po podaniu *i.p.* Stężenie TC-G 1008 zostało oznaczone w mózgu i surowicy przy pomocy metody chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (ang. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS). Oznaczenie to zostało wykonane przez dr Małgorzatę Szafarz, pod kierownictwem Prof. Elżbiety Wyski, na Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium Medicum.

Uzyskane wyniki zostały podzielone pomiędzy główny manuskrypt i suplement.

Zaobserwowano, że:

- 30 minut po podaniu pojedynczej dawki TC-G 1008 *i.p.* u myszy Swiss Albino, związek osiąga w mózgu stężenie wystarczające do działania poprzez GPR39 (wyniki w głównym manuskrypcie)
- TC-G 1008 i ZnCl<sub>2</sub> wywierają przeciwstawne efekty w testach progów MEST i 6-Hz (wyniki w głównym manuskrypcie):
  - TC-G 1008 i ZnCl<sub>2</sub> obniżają próg drgawkowy w teście MEST; działają więc w tym teście przeciwnie do VPA, który podwyższa próg drgawkowy
  - TC-G 1008 i ZnCl<sub>2</sub> podwyższają próg drgawkowy indukowany prądem 6-Hz; działają więc w tym teście podobnie do VPA, który także podwyższa próg drgawkowy
- TC-G 1008 i ZnCl<sub>2</sub> nasilają drgawki wywołane jednorazowym podaniem kwasu kainowego *i.p.*: TC-G 1008 nasila jeden z parametrów ocenianych po podaniu kwasu kainowego, ale nie śmiertelność, podczas gdy ZnCl<sub>2</sub> nasila zarówno ten parametr, jak i śmiertelność (wyniki w głównym manuskrypcie):



- TC-G 1008 nie wywłya na drgawki behawioralne w teście proggu drgawkowego wywołanego *i.v.* infuzją pentetrazolu; duże dawki cynku obniżają ten próg (wyniki w suplemencie)
- TC-G 1008 nasila drgawki elektroencefalograficzne wywołane pentetrazolem u larw ryb *Danio rerio* (wyniki w głównym manuskrypcie)
- TC-G 1008 nasila rozwój padaczki w modelu kindlingu pentetrazolowego u myszy Swiss Albino (wyniki w głównym manuskrypcie)
  - TC-G 1008 wywołał drgawki rozniecane u 87% myszy Swiss Albino
- TC-G 1008 nasila rozwój padaczki w modelu kindlingu pentetrazolowego u myszy dzikich, ale nie u myszy *Gpr39 knockout* (wyniki w głównym manuskrypcie)
  - TC-G 1008 wywołał drgawki rozniecane u 83.3% myszy dzikich C57BL/6/Tar x CBA/Tar

Uzyskane obserwacje umożliwiły opisanie kaskady zjawisk:

- TC-G 1008 nasila rozwój padaczki w modelu kindlingu pentetrazolowego działając poprzez GPR39

W ten sposób w omawianej publikacji po raz pierwszy:

- Scharakteryzowano fenotyp myszy *Gpr39 knockout* w odniesieniu do procesu epileptogenezy
- Wykazano, że aktywacja GPR39 powoduje nasilenie procesu epileptogenezy

Zaobserwowane nasilenie epileptogenezy poprzez aktywację GPR39, a także nasilenie drgawek ostrych po podaniu TC-G 1008 (w teście MEST, po podaniu kwasu kainowego *i.p.*, w zapisie elektroencefalograficznym u larw *Danio rerio*) jest wynikiem przeciwnym do hipotezy badawczej projektu. Hipoteza badawcza projektu zakładała, że TC-G 1008 będzie hamował drgawki, a aktywacja GPR39 będzie chroniła przed rozwojem padaczki. Hipoteza ta opierała się o wyniki prac *in vitro* i jednej pracy *in vivo*, która wskazała, że myszy *Gpr39 knockout* cechują się większą wrażliwością na drgawki ostre wywołane jednorazowym podaniem kwasu kainowego *i.p.*

W dalszej części doświadczeń próbowano znaleźć mechanizm, który może leżeć u podłoża obserwowanych zjawisk. Projekt 2016/20/S/NZ7/00424 uzyskał

finansowanie w ramach konkursu Fuga Narodowego Centrum Nauki. W muzyce fuga jest kunsztowną formą opartą na temacie, który często powraca. W projekcie badawczym powracającym tematem były **pule cynku (cynk całkowity, cynk wolny) i ekspresja białek szlaku sygnalizacyjnego związanego z receptorem.**

Wykonano analizę biochemiczną surowicy i hipokampa. Hipokamp został wybrany jako struktura mózgu istotna dla etiopatogenezy padaczki (Thom, 2014) i jako struktura bogata w cynk (Blixhavn i wsp., 2023). W surowicy myszy Swiss Albino i C57BL/6/Tar × CBA/Tar oznaczono stężenie cynku całkowitego metodą ICP-OES (oznaczenia wykonane przez dr Jana Sawickiego pod kierownictwem Prof. Ireneusza Sowy). Cynk całkowity analizowano w skrawkach hipokampa myszy C57BL/6/Tar × CBA/Tar metodą LA-ICP MS (oznaczenia wykonane przez dr Adama Sajnoga pod kierownictwem Prof. Danuty Barańkiewicz). Wolny cynk analizowano przy pomocy sondy fluorescencyjnej Zinpyr-1 w skrawkach hipokampa myszy Swiss Albino i C57BL/6/Tar × CBA/Tar (metoda opracowana wspólnie z dr Anną Rafała-Ulińską, Prof. Bernadetą Szewczyk i Prof. Marzeną Maćkowiak z Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, na podstawie publikacji Prof. Andreasa Grabruckera z Uniwersytetu w Limerick). Wyniki biochemiczne dotyczące myszy modyfikowanych genetycznie przedstawiono w głównym manuskrypcie. Wyniki biochemiczne dotyczące myszy niemodyfikowanych genetycznie (Swiss Albino) przedstawiono w suplemencie.

U myszy C57BL/6/Tar × CBA/Tar uczestniczących w modelu kindlingu pentetrazolowego zaobserwowano:

- Obniżone stężenie cynku całkowitego w surowicy myszy *Gpr39 knockout* w porównaniu do myszy dzikich
- Brak różnic w poziomie cynku całkowitego w hipokampie myszy *Gpr39 knockout* w porównaniu do myszy dzikich
- Tendencję do nasilenia ekspresji (badanej metodą Western blot) sensora wolnego cynku wewnątrzkomórkowego - czynnika transkrypcyjnego MTF1 w hipokampie myszy dzikich otrzymujących wielokrotnie TC-G 1008 w porównaniu do kontrolnych myszy dzikich
- Zwiększenie poziomu wewnątrzkomórkowego cynku wolnego w hipokampie, badanego przy pomocy sondy Zinpyr-1, u myszy dzikich

otrzymujących wielokrotnie TC-G 1008 w porównaniu do kontrolnych myszy dzikich (wyniki w głównym manuskrypcie)

Powyższe obserwacje wskazały, że:

- Nasilenie procesu epileptogenezy u myszy dzikich otrzymujących TC-G 1008 może być związane ze zwiększonym poziomem wolnego cynku wewnątrzkomórkowego
- Zasadne jest badanie cynku wolnego, ponieważ zmiany w tej puli nie odzwierciedlają zmian w stężeniu całkowitym

Wpływ jednorazowych i wielokrotnych podań TC-G 1008, ZnCl<sub>2</sub> lub VPA u myszy Swiss Albino poddanych drgawkom ostrym (MES, 6-Hz) lub rozniecany (kindling pentetrazolowy) oraz u myszy, u których wykonano pozorowane procedury (ang. *sham/nonkindled mice*) na stężenie cynku całkowitego w surowicy i poziom wolnego cynku wewnątrzkomórkowego w hipokampie przedstawiono w suplemencie. Przedstawione tam analizy biochemiczne nie pozwoliły na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków na temat mechanizmów stojących na przeciwstawnym działaniem jednorazowych dawek agonistów GPR39: TC-G 1008 i ZnCl<sub>2</sub> w dwóch ostrych testach progu drgawkowego: MEST i 6-Hz. Zaobserwowano jednak, że niskie dawki TC-G 1008, nieefektywne w teście MEST oraz dawki TC-G 1008 działające w teście progu 6-Hz były związane z niższym poziomem wolnego cynku wewnątrzkomórkowego w hipokampie.

Dane dotyczące barwienia Zinpyr-1, przedstawione w głównym manuskrypcie i w suplemencie, pochodzą z analizy ok. 175 mózgów. Uwzględniając techniczne powtórzenia, analizę trzech obszarów hipokampa: CA1, CA3 i zakrętu zębatego oraz kontrolę przy pomocy przenikającego przez błony komórkowe chelatora TPEN (ang. *N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine*), dane te opierają się o analizę ponad 3000 zdjęć mikroskopowych fragmentów mózgu.

Następnie skoncentrowano się na ścieżce sygnalizacyjnej GPR39. Receptor ten jest związany z kilkoma rodzajami białek G, m.in. Gq i Gs, a także rekrutuje β-arestynę (Holst i wsp., 2007). Powyższe szlaki są również aktywowane przez TC-G 1008 (Peukert i wsp., 2014; Sato i wsp., 2016). Sygnalizacja poprzez białka Gq i Gs zbiega się na czynniku transkrypcyjnym CREB (ang. *cAMP response element binding protein*, czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cAMP). W jądrze komórkowym

CREB nasila ekspresję min. genu dla czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF). Sygnalizacja białka BDNF poprzez receptor kinazy B związanej z tropomiozyną (ang. *tropomyosin-related kinase B*, TrkB) odgrywa rolę w epileptogenezie (Simonato i wsp., 2006). Należy podkreślić, że rola BDNF w patofizjologii padaczki może być przeciwna do roli tego białka w patofizjologii depresji. W padaczce wzrost BDNF może być związany z nasileniem epileptogenezy, choć zależność przyczynowo-skutkowa jest poddawana w wątpliwość (Simonato i wsp., 2006).

Przedstawiono wyniki oznaczeń aktywacji CREB i TrkB (mierzone jako stosunek ekspresji na poziomie białka form ufosforylowanych do całkowitych: ang. *phosphorylated/total* CREB (p-CREB/CREB), *phosphorylated/total* TrkB (p-TrkB/TrkB); oznaczenia zostały wykonane metodą Western blot) oraz ekspresji BDNF (na poziomie białka; Western blot) w hipokampach myszy modyfikowanych genetycznie (C57BL/6/Tar × CBA/Tar *Gpr39 knockout*) (wyniki w manuskrypcie) i niemodyfikowanych genetycznie (Swiss Albino) (wyniki w suplemencie).

U myszy C57BL/6/Tar × CBA/Tar uczestniczących w modelu kindlingu pentetrazolowego zaobserwowano:

- Znaczne i istotne statystycznie zwiększenie ekspresji p-CREB (o 137%) i stosunku p-CREB/CREB (o 115%) w hipokampie myszy *Gpr39 knockout* po wielokrotnych podaniach TC-G 1008
- Zwiększenie (o 59%) stosunku p-TrkB/TrkB w hipokampie myszy *Gpr39 knockout* po wielokrotnych podaniach TC-G 1008 (wyniki w głównym manuskrypcie)

Te dane jednoznacznie wskazują, że:

- TC-G 1008 działa także poprzez inne niż GPR39 cele molekularne, gdy jest podawany *in vivo*

W powyższy sposób po raz pierwszy:

- Zbadano selektywność farmakologicznego narzędzia modelowego TC-G 1008 przy użyciu myszy *Gpr39 knockout*
- Wykazano nieselektywne działanie TC-G 1008 *in vivo*

Uzyskane dane, choć zaskakujące, są zbieżne z wynikami otrzymanymi przez Sato i wsp. 2016, którzy wykonali krzywe zależności stężenie-odpowiedź rekrutacji  $\beta$ -arestyny przez TC-G 1008 wobec receptora 5-HT1A. Zaobserwowali oni odpowiedź wobec 5-HT1A, a więc aktywację celu innego niż GPR39 (Sato i wsp., 2016). Fakt ten został podniesiony przez Prof. Alberta, farmakologa z Uniwersytetu w Ottawie (Albert, 2020). Konieczność walidacji działania TC-G 1008 została ponadto zaproponowana przez Laitakari i wsp. (2021). Mimo tego, w momencie składania pracy **P2** do recenzji, w bazie PubMed istniało 18 wyników wyszukiwania dla frazy TC-G 1008, ale w żadnej z tych prac nie zbadano czy w efektach TC-G 1008 *in vivo* rzeczywiście uczestniczy GPR39, ponieważ nie było on podawany myszom *Gpr39 knockout*. W kontekście uzyskanych wyników, na uwagę zasługuje doświadczenie *in vitro*, w którym TC-G 1008 zwiększył ekspresję CREB w komórkach hipokampa (HT-22), ale wyciszenie GPR39 przez krótki interferujący RNA (ang. *short interfering RNA*, siRNA) nie zniósło tego efektu, co sugeruje, że wiele mechanizmów przyczynia się do wpływu TC-G 1008 na ekspresję CREB (Mo i wsp., 2020). Powyższe informacje zostały zebrane w pracy przeglądowej, która obecnie znajduje się w recenzji w czasopiśmie *Drug Discovery Today*.

Wpływ jednorazowych i wielokrotnych podań TC-G 1008, ZnCl<sub>2</sub> lub VPA u myszy poddanych drgawkom ostrym (MES, 6-Hz) lub rozniecany (kindling pentetrazolowy) oraz u myszy, u których wykonano pozorowane procedury (ang. *sham/non-kindled mice*) na aktywację CREB i TrkB oraz poziom ekspresji BDNF u myszy Swiss Albino przedstawiono w suplemencie. Wskazują one, że nasilenie ekspresji BDNF obserwowane po podaniu TC-G 1008, proponowane jako strategia neurotroficzna, może być zjawiskiem przejściowym, ponieważ po wielokrotnych podaniach związku nie zaobserwowano nasilenia ekspresji tego czynnika. Także nowi agoniści GPR39 nie wywarli działania neurotroficznego *in vitro* (Burley i wsp., 2022).

Podjęto również próby oceny korelacji efektów behawioralnych z biochemicznymi. Badania przedstawione w suplemencie wykazały jednak, że taki sam kierunek zmian, tj. hamowanie aktywacji CREB i TrkB w hipokampie, był obserwowany w modelu kindlingu pentetrazolowego po podaniu TC-G 1008, ZnCl<sub>2</sub> i VPA, podczas gdy każdy z tych związków wywarł odmienny wpływ na drgawki behawioralne – TC-G 1008 nasilał, VPA hamował, a ZnCl<sub>2</sub> nie wpływał istotnie na epileptogenezę w tym modelu. Zatem zmiany w ekspresji tych białek nie towarzyszyły jednemu efektowi behawioralnemu.

Podsumowując, z doświadczeń opisanych w publikacji **P2** płyną dwa główne wnioski:

- W modelu kindlingu pentetrazolowego, aktywacja GPR39 powoduje nasilenie, a nie, jak przypuszczano, hamowanie procesu epileptogenezy
- Powszechnie stosowany agonista GPR39 (TC-G 1008) wywiera działanie nieselektywne w hipokampie

### (P3)

**Doboszevska U**, Socała K, Pieróg M, Nieoczvm D, Sawicki J, Sajnóg A, Szewczyk B, Mlyniec K, Sowa I, Barańkiewicz D, Właż P. Dietary Zinc Differentially Regulates the Effects of the GPR39 Receptor Agonist, TC-G 1008, in the Maximal Electroshock Seizure Test and Pentylenetetrazole-Kindling Model of Epilepsy. *Cells*. 2023;12(2):264.

Kolejnym etapem realizacji projektu 2016/20/S/NZ7/00424 była ocena wpływu diety niskocynkowej na pobudliwość drgawkową i epileptogenezę w odniesieniu do GPR39. Wpływ cynku na działanie TC-G 1008 został wykazany *in vitro* – pierwiastek ten jest pozytywnym allosterycznym modulatorem dla działania TC-G 1008 (Sato i wsp., 2016). Szlak Gs jest szczególnie wrażliwy na modulację – Sato i wsp. (2016) zaobserwowali, że w przypadku braku cynku TC-G 1008 nie powoduje wzrostu cAMP. Opierając się na tych danych, a także danych przedstawionych w publikacji przeglądowej **P1**, dotyczących związku pomiędzy niedoborem cynku a padaczką zarówno w aspekcie przedklinicznym, jak i klinicznym, w pracy **P3** zbadano zależność pomiędzy niedoborem cynku wywołanym dietą, a działaniem TC-G 1008 w wybranych modelach drgawek i padaczki. Test MEST, model drgawek ostrych MES i model drgawek rozniecanych (kindling pentetrazolowy) zostały wybrane na podstawie efektów opisanych w publikacji **P2**. Podobnie jak w pracy **P2**, TC-G 1008 badano w odniesieniu do ZnCl<sub>2</sub> i VPA. Niedobór cynku został wywołany stosowaniem diety niskocynkowej przez 4 tygodnie. Został on potwierdzony na podstawie znacznego zmniejszenia stężenia cynku całkowitego w surowicy i zmniejszenia masy ciała myszy. Stężenie cynku całkowitego w surowicy zostało oznaczone przez dr Jana Sawickiego, który pod kierownictwem Prof. Ireneusza Sowy użył do tego celu metody ICP-OES. Kontynuowano także współpracę z dr Adamem Sajnogiem, który pod kierownictwem Prof. Danuty Barańkiewicz wykonał oznaczenia cynku całkowitego w skrawkach hipokampa metodą LA-ICP-MS.

Zaobserwowano, że:

- TC-G 1008 podany jednokrotnie obniżył próg drgawkowy w teście MEST u myszy otrzymujących paszę niskocynkową, ale nie u myszy otrzymujących paszę o zwiększonej zawartości cynku
- TC-G 1008 podawany wielokrotnie nasilił proces epileptogenezy w modelu kindlingu pentetrazolowego u myszy otrzymujących paszę o zwiększonej zawartości cynku, ale nie u myszy otrzymujących paszę niskocynkową
- TC-G 1008 podawany wielokrotnie wywołał drgawki rozniecane u 85% myszy otrzymujących dietę o zwiększonej zawartości cynku i pentetrazol, spowodował więc efekt podobny do tego opisanego w publikacji **P2**, gdzie drgawki rozniecane zaobserwowano u 87% myszy Swiss Albino i u 83.3% myszy dzikich C57BL/6/Tar x CBA/Tar

W ten sposób:

- Potwierdzono wyniki publikacji **P2**, które wskazały na obniżenie progu drgawkowego i nasilenie epileptogenezy po podaniu TC-G 1008
- Wykazano, że podaż cynku jest czynnikiem modulującym wpływ aktywacji GPR39 na przebieg epileptogenezy

Potwierdzenie wyników uzyskanych w publikacji **P2** było konieczna, ponieważ zaostrenie drgawek ostrych przez TC-G 1008, a w odniesieniu do kindlingu pentetrazolowego pogorszenie chronicznego procesu rozwoju padaczki poprzez aktywację GPR39, jest sprzeczne z dominującą hipotezą o aktywacji GPR39 jako potencjalnej nowej strategii terapeutycznej do leczenia padaczki.

W pracy **P3** wykazano, że zawartość cynku w diecie moduluje efekty TC-G 1008 i/lub funkcje GPR39. Uzyskane wyniki są spójne z wynikami Sunuwara i wsp. (2017), którzy wykazali wpływ zmieniającej się zawartości cynku w diecie na efekty *Gpr39* knockout w odniesieniu do modelu biegunki wywołanej podaniem toksyny cholery.

#### **(P4)**

**Doboszevska U**, Sawicki J, Sajnóg A, Szopa A, Serefko A, Socala K, Pieróg M, Nieoczym D, Mlyniec K, Nowak G, Barałkiewicz D, Sowa I, Wlaź P. Alterations of Serum Magnesium Concentration in Animal Models of Seizures and Epilepsy-The Effects of Treatment with a GPR39 Agonist and Knockout of the *Gpr39* Gene. *Cells*. 2022;11(13):1987.

Doświadczenie przedstawione w publikacji **P2** wskazało na zmniejszenie stężenia cynku całkowitego w surowicy myszy *Gpr39 knockout* w modelu kindlingu pentetrazolowego, w porównaniu do myszy dzikich. Obok cynku, magnez jest kolejnym pierwiastkiem stanowiącym przedmiot zainteresowań grup badawczych, w których pracach uczestniczyłam od czasów studiów doktoranckich. Działania magnezu i cynku są częściowo spójne na poziomie biochemii/farmakologii. Kanał jonowy TRPM7 jest przepuszczalny dla obu jonów. W jelitach TRPM7 jest głównym regulatorem ich równowagi (Laitakari i wsp., 2021). Prawdopodobnie w mózgu TRPM7 jest ważny dla homeostazy tych dwuwartościowych kationów (Zou i wsp., 2022). Analiza danych literaturowych, wykonana w ramach publikacji **P1** wskazała na TRPM7 jako potencjalny cel molekularny istotny dla patofizjologii/leczenia padaczki. Ponadto cynk i magnez modulują funkcję kanałów TRP (Frimurer i wsp., 2017) i receptorów, np. NMDAR (Szewczyk i wsp., 2018). Dlatego w kolejnym etapie doświadczeń oznaczono stężenia magnezu całkowitego w surowicy myszy Swiss Albino uczestniczących w modelach drgawek lub epileptogenezy oraz w surowicy myszy C57BL/6/Tar × CBA/Tar *Gpr39 knockout* uczestniczących w modelu kindlingu pentetrazolowego. Celem tych oznaczeń było wstępne zbadanie, czy GPR39 jest kolejnym celem molekularnym powiązanym z homeostazą dwóch badanych pierwiastków.

U myszy Swiss Albino zaobserwowano:

- Zwiększenie stężenia magnezu całkowitego w surowicy myszy, u których wywołano drgawki ostre MES lub drgawki rozniecane (kindling pentetrazolowy), ale nie u myszy, u których wywołano drgawki ostre indukowane prądem 6-Hz

Powyższą obserwację można zinterpretować jako:

- Zwiększenie stężenia magnezu całkowitego w surowicy po wywołaniu uogólnionych drgawek toniczno-klonicznych (MES, kindling pentetrazolowy), ale nie po wywołaniu drgawek częściowych

U myszy C57BL/6/Tar × CBA/Tar uczestniczących w modelu kindlingu pentetrazolowego zaobserwowano:



- Obniżone stężenie magnezu całkowitego (badane metodą ICP-OES) w surowicy myszy *Gpr39 knockout* w porównaniu do myszy dzikich
- Brak różnic w poziomie magnezu całkowitego (badane metodą LA-ICP-MS) w hipokampie myszy *Gpr39 knockout*, w porównaniu do myszy dzikich
- Zmniejszenie ekspresji TRMP7 (odpowiadającego za transport magnezu do przestrzeni wewnątrzkomórkowej) na poziomie białka (badane metodą Western blot) w hipokampie myszy *Gpr39 knockout* po wielokrotnych podaniach TC-G 1008
- Zwiększenie ekspresji transportera SLC41A1 (odpowiadającego za transport magnezu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej) w hipokampie myszy *Gpr39 knockout* po wielokrotnych podaniach TC-G 1008, w porównaniu do myszy dzikich otrzymujących związek

Poprzez zbadanie poziomu ekspresji TRPM7

- Potwierdzono wyniki publikacji P2, które wskazały na nieselektywne działanie TC-G 1008 w hipokampie

W trakcie pisania prac **P1** i **P4** nie było bezpośredniego dowodu na działanie przeciwdrgawkowe związane z hamowaniem TRPM7. W pracy przeglądowej **P1** omówiono wyniki doświadczeń sugerujących takie działanie. Zostały one wykonane z użyciem karwakrolu, który jest inhibitorem TRPM7, ale nie działa selektywnie. W publikacji **P1** zastrzeżono więc, że efekt przeciwdrgawkowy karwakrolu *in vivo* może wynikać z inhibicji TRMP7, ale też z innych mechanizmów. Od tego czasu opracowano selektywny inhibitor TRPM7, waiksenicynę (Steinborn i wsp., 2023). Ostatnio przeprowadzone badania *in vitro* skrawków kory śródwęchowej i hipokampa wykazały, że waiksenicyna hamuje wyładowania prowokowane niskim stężeniem magnezu lub pentetrazolem (Khalil i wsp., 2023), wykazując, że działanie przeciwdrgawkowe może zostać osiągnięte poprzez inhibicję TRPM7. W publikacji **P4** zaobserwowano zmniejszoną ekspresję TRPM7 na poziomie białka (badaną metodą Western blot) w hipokampie myszy *Gpr39 knockout* otrzymujących wielokrotnie TC-G 1008, w porównaniu do myszy dzikich otrzymujących ten związek w przebiegu kindlingu pentetrazolowego. Nie odnotowano różnic w poziomie ekspresji białka pomiędzy kontrolnymi (otrzymującymi rozpuszczalnik) grupami myszy *Gpr39 knockout* i dzikimi.

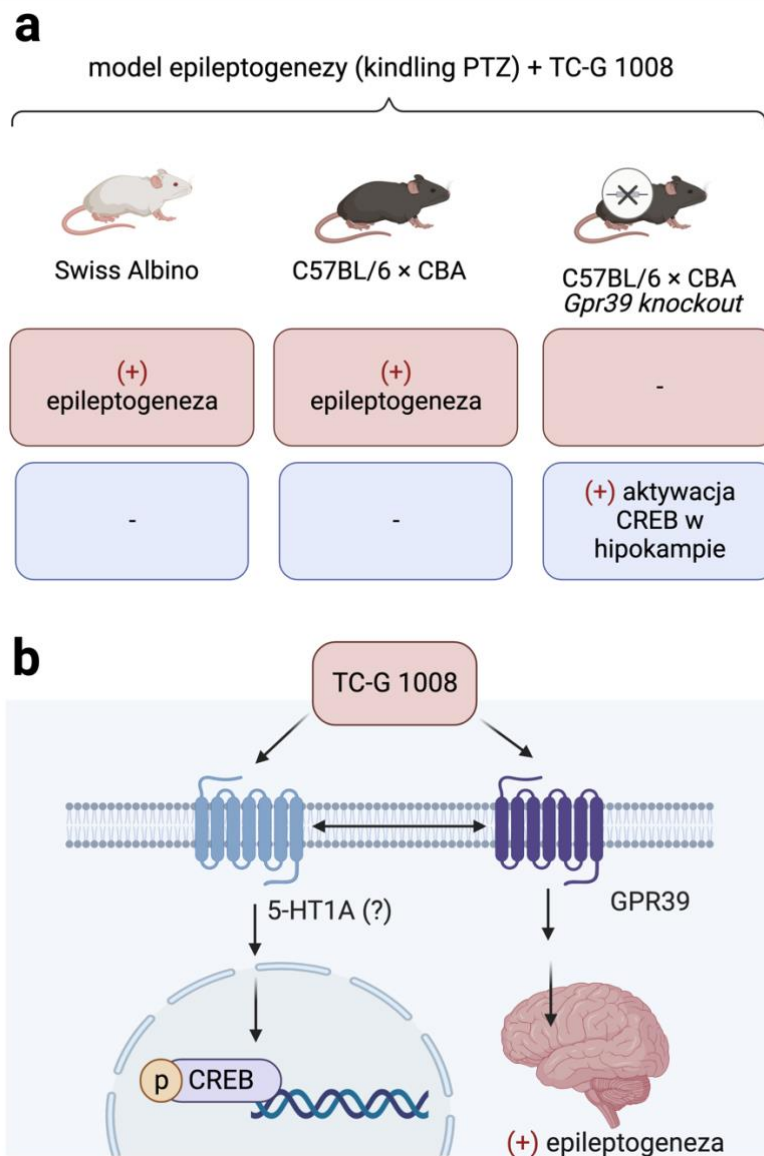
U myszy *Gpr39 knockout* otrzymujących TC-G 1008, w przeciwieństwie do myszy dzikich otrzymujących ten związek, nie występowały drgawki rozniecane (**P2**). Na podstawie tych obserwacji, w pracy **P4**, stwierdzono, że mniej nasilone drgawki rozniecane u myszy *Gpr39 knockout* otrzymujących TC-G 1008 towarzyszą zmniejszonej ekspresji TRPM7 i mogą wynikać z osłabienia funkcji kanału w hipokampie. Niedawno opublikowana praca przemawia za słusnością takiego rozumowania.

#### 4.3.4. Podsumowanie i wnioski

Doświadczenia wykonane w ramach przedstawionego cyklu artykułów dostarczyły dwóch nieoczekiwanych rezultatów. Po pierwsze, aktywacja GPR39 powoduje nasilenie procesu rozwoju padaczki *in vivo*. Wniosek opiera się na obserwacji, że TC-G 1008 nasila epileptogenezę indukowaną pentetrazolem u myszy dzikich, ale nie u myszy *Gpr39 knockout*. Zaobserwowany efekt jest więc wywołany działaniem TC-G 1008 poprzez GPR39 (**P2**). Uzyskany wynik jest przeciwstawny do wyjściowej hipotezy, która zakładała, że aktywacja GPR39 powoduje efekt przeciwpadaczkowy.

Uzyskany „negatywny” wynik, który nie potwierdził istniejącej hipotezy, w rzeczywistości może być „pozytywny” dla nauki. Nie wykazano działania przeciwpadaczkowego, ale pro-epileptogenne. W ten sposób pogłębiono wiedzę na temat patofizjologii drgawek rozniecanych i opisano nowy mechanizm molekularny związany z epileptogenezą. Dane te sugerują też, że nasilenie padaczki może być niepożądanym skutkiem ubocznym przyszłych leków, które będą działać poprzez aktywację GPR39. Chociaż żaden taki lek nie jest obecnie dostępny na rynku, leki przeciwnowotworowe znajdujące się w badaniach klinicznych są agonistami. Opracowywane są także leki agonistyczne, które mają służyć do leczenia innych chorób.

Po drugie, TC-G 1008 może działać także poprzez inne niż GPR39 cele molekularne. Wniosek ten opiera się na analizie ekspresji białka czynnika transkrypcyjnego CREB w hipokampie myszy *Gpr39 knockout*, która wykazała aktywację CREB u tych myszy, wykazując w ten sposób brak selektywności TC-G 1008 (**P2**). Uzyskane dane sugerują, że agonista GPR39 może indukować także inne mechanizmy po podaniu *in vivo*. Te dwa główne wyniki obrazuje **Rycina 3**.



**Rycina 3. Podsumowanie najważniejszych wyników uzyskanych w toku realizacji doświadczeń.** TC-G 1008 nasila epileptogenezę indukowaną pentetrazolem (PTZ) działając poprzez GPR39, ale powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego CREB w hipokampie, działając poprzez inne cele molekularne. (P2, zmodyfikowane)

W publikacjach P3 i P4 potwierdzono zjawiska zaobserwowane w publikacji P2. Praca P3 umożliwiła potwierdzenie wyników dotyczących nasilenia epileptogenezy indukowanej pentetrazolem po podaniu TC-G 1008. Praca P4 umożliwiła

potwierdzenie wyników dotyczących nieselektywnego działania TC-G 1008 w hipokampie (wpływ na ekspresję białka kanału TRPM7).

Dane eksperymentalne umożliwiły sformułowanie wniosku, że TC-G 1008 działa poprzez GPR39, ale także inne cele molekularne. Sugerują one więc, że niektóre z wcześniejszych efektów przypisywanych TC-G 1008 i aktywacji GPR39 opisanych w literaturze mogą być związane z jego działaniem poprzez receptor 5-HT<sub>1A</sub> i/lub inne cele molekularne. Ma to niebagatelne znaczenie dla interpretacji wyników doświadczeń i płynących z nich konkluzji na temat funkcji GPR39 i dla kierunków poszukiwań leków: agonistów/antagonistów GPR39. W perspektywie krótkoterminowej, nasze dane mogą stymulować dyskusję na temat konieczności stosowania innych narzędzi modelowych (agonistów), aby możliwy był postęp w poznaniu roli GPR39. W perspektywie długoterminowej mogą one doprowadzić do zmiany niektórych z dotychczasowych hipotez na temat funkcji GPR39 w stanach fizjologicznych i patofizjologicznych.

#### 4.3.5. Piśmiennictwo

- Albert P.R. (2020) Orphans to the rescue: orphan G-protein coupled receptors as new antidepressant targets. *J Psychiatry Neurosci* 45:301-303.
- Alexander S.P.H., Battey J., Benson H.E., Benya R.V., Bonner T.I., Davenport A.P., Singh K.D., Eguchi S., Harmar A., Holliday N., Jensen R.T., Karnik S., Kostenis E., Liew W.C., Monaghan A.E., Mpamhanga C., Neubig R., Pawson A.J., Pin J.-P., Sharman J.L., Spedding M., Spindel E., Stoddart L., Storjohann L., Thomas W.G., Tirupula K., Vanderheyden P. (2020) Class A Orphans (version 2020.5) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology* CITEdoi: 10.2218/topdb/F16/2020.5.
- Alexander S.P.H., Christopoulos A., Davenport A.P., Kelly E., Mathie A., Peters J.A., Veale E.L., Armstrong J.F., Faccenda E., Harding S.D., Pawson A.J., Sharman J.L., Southan C., Davies J.A. (2019) The Concise Guide to Pharmacology 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 176 Suppl 1:S21-S141.
- Alkayed N.J., Cao Z., Qian Z.Y., Nagarajan S., Liu X., Nelson J.W., Xie F., Li B., Fan W., Liu L., Grafe M.R., Davis C.M., Xiao X., Barnes A.P., Kaul S. (2022) Control of coronary vascular resistance by eicosanoids via a novel GPCR. *Am J Physiol Cell Physiol* 322:C1011-C1021.
- Alker W., Schwerdtle T., Schomburg L., Haase H. (2019) A zinpyr-1-based fluorimetric microassay for free zinc in human serum. *Int J Mol Sci* 20:4006.
- Besser L., Chorin E., Sekler I., Silverman W.F., Atkin S., Russell J.T., Hershinkel M. (2009) Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus. *J Neurosci* 29:2890-2901.

- Blixhavn C.H., Haug F.S., Kleven H., Puchades M.A., Bjaalie J.G., Leergaard T.B. (2023) A Timm-Nissl multiplane microscopic atlas of rat brain zincergic terminal fields and metal-containing glia. *Sci Data* 10:150-02012.
- Burley R., Hewer R.C., Teall M., Dickson L., Ossola B., Russell S., Bender C., Cheung T., Powell J.A.C., Xu X., Brice N.L., Otter L., Arimont M., Kidd S.L., Vidal D., Dale J.W., Mervin L., Sore H.F., Mateu N., Lakshminarayana N., Dawson L.A., Carlton M., Burli R.W. (2022) Synthesis and SAR of novel GPR39 agonists and positive allosteric modulators. *Bioorg Med Chem Lett* 61:128607.
- Chartrel N., Alvear-Perez R., Leprince J., Iturrioz X., Reaux-Le G.A., Audinot V., Chomarat P., Coge F., Nosjean O., Rodriguez M., Galizzi J.P., Boutin J.A., Vaudry H., Llorens-Cortes C. (2007) Comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake". *Science* 315:766.
- Chen N.N., Zhao D.J., Sun Y.X., Wang D.D., Ni H. (2019) Long-term effects of zinc deficiency and zinc supplementation on developmental seizure-induced brain damage and the underlying GPR39/ZnT-3 and MBP expression in the hippocampus. *Front Neurosci* 13:920.
- Chorin E., Vinograd O., Fleidervish I., Gilad D., Herrmann S., Sekler I., Aizenman E., Hershinkel M. (2011) Upregulation of KCC2 activity by zinc-mediated neurotransmission via the mZnR/GPR39 receptor. *J Neurosci* 31:12916-12926.
- Cole T.B., Wenzel H.J., Kafer K.E., Schwartzkroin P.A., Palmiter R.D. (1999) Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1716-1721.
- Dalic L., Cook M.J. (2016) Managing drug-resistant epilepsy: challenges and solutions. *Neuropsychiatr Dis Treat* 12:2605-2616.
- Davenport A.P., Alexander S.P., Sharman J.L., Pawson A.J., Benson H.E., Monaghan A.E., Liew W.C., Mpamhanga C.P., Bonner T.I., Neubig R.R., Pin J.P., Spedding M., Harmar A.J. (2013) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVIII. G protein-coupled receptor list: recommendations for new pairings with cognate ligands. *Pharmacol Rev* 65:967-986.
- Davis C.M., Bah T.M., Zhang W.H., Nelson J.W., Golgotiu K., Nie X., Alkayed F.N., Young J.M., Woltjer R.L., Silbert L.C., Grafe M.R., Alkayed N.J. (2021) GPR39 localization in the aging human brain and correlation of expression and polymorphism with vascular cognitive impairment. *Alzheimers Dement (N Y)* 7:e12214.
- Dershem R., Metpally R.P.R., Jeffreys K., Krishnamurthy S., Smelser D.T., Hershinkel M., Carey D.J., Robishaw J.D., Breitwieser G.E. (2019) Rare-variant pathogenicity triage and inclusion of synonymous variants improves analysis of disease associations of orphan G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 294:18109-18121.
- Doboszewska U., Maret W., Wlaz P. (2023) GPR39 deorphanization: the long and winding road to eicosanoids and a crosstalk between GPR39 and hedgehog signaling in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120:e2308227120.
- Fjellstrom O., Larsson N., Yasuda S., Tsuchida T., Oguma T., Marley A., Wennberg-Huldt C., Hovdal D., Fukuda H., Yoneyama Y., Sasaki K., Johansson A., Lundqvist S., Brengdahl J., Isaacs R.J., Brown D., Geschwindner S., Bentham L., Priest C., Turnbull A. (2015)

- Novel Zn<sup>2+</sup> modulated GPR39 receptor agonists do not drive acute insulin secretion in rodents. *PLoS One* 10:e0145849.
- Fredriksson R., Lagerstrom M.C., Lundin L.G., Schioth H.B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63:1256-1272.
- Freudenberg J.M., Dunham I., Sanseau P., Rajpal D.K. (2018) Uncovering new disease indications for G-protein coupled receptors and their endogenous ligands. *BMC Bioinformatics* 19:345-2392.
- Frimurer T.M., Mende F., Graae A.S., Engelstoft M.S., Egerod K.L., Nygaard R., Gerlach L.O., Hansen J.B., Schwartz T.W., Holst B. (2017) Model-based discovery of synthetic agonists for the Zn<sup>2+</sup>-sensing G-protein-coupled receptor 39 (GPR39) reveals novel biological functions. *J Med Chem* 60:886-898.
- Galanopoulou A.S., Buckmaster P.S., Staley K.J., Moshe S.L., Perucca E., Engel J., Jr., Loscher W., Noebels J.L., Pitkanen A., Stables J., White H.S., O'Brien T.J., Simonato M. (2012) Identification of new epilepsy treatments: issues in preclinical methodology. *Epilepsia* 53:571-582.
- Garcia V., Gilani A., Shkolnik B., Pandey V., Zhang F.F., Dakarapu R., Gandham S.K., Reddy N.R., Graves J.P., Gruzdev A., Zeldin D.C., Capdevila J.H., Falck J.R., Schwartzman M.L. (2017) 20-HETE signals through G-protein-coupled receptor GPR75 (G<sub>q</sub>) to affect vascular function and trigger hypertension. *Circ Res* 120:1776-1788.
- Gilad D., Shorer S., Ketzef M., Friedman A., Sekler I., Aizenman E., Hershinkel M. (2015) Homeostatic regulation of KCC2 activity by the zinc receptor mZnR/GPR39 during seizures. *Neurobiol Dis* 81:4-13.
- Hauser A.S., Attwood M.M., Rask-Andersen M., Schioth H.B., Gloriam D.E. (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16:829-842.
- Hauser A.S., Chavali S., Masuho I., Jahn L.J., Martemyanov K.A., Gloriam D.E., Babu M.M. (2018) Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets. *Cell* 172:41-54.
- Hershinkel M., Moran A., Grossman N., Sekler I. (2001) A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular Ca<sup>2+</sup> and regulates ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11749-11754.
- Holst B., Egerod K.L., Schild E., Vickers S.P., Cheetham S., Gerlach L.O., Storjohann L., Stidsen C.E., Jones R., Beck-Sickinger A.G., Schwartz T.W. (2007) GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* 148:13-20.
- Iovino L., Cooper K., deRoos P., Kinsella S., Evandy C., Ugrai T., Mazziotta F., Ensby K.S., Granadier D., Hopwo K., Smith C., Gagnon A., Galimberti S., Petrini M., Hill G.R., Dudakov J.A. (2022) Activation of the zinc-sensing receptor GPR39 promotes T-cell reconstitution after hematopoietic cell transplant in mice. *Blood* 139:3655-3666.
- Jauhar S., Arnone D., Baldwin D.S., Bloomfield M., Browning M., Cleare A.J., Corlett P., Deakin J.F.W., Erritzoe D., Fu C., Fusar-Poli P., Goodwin G.M., Hayes J., Howard R., Howes O.D., Juruena M.F., Lam R.W., Lawrie S.M., McAllister-Williams H., Marwaha S., Matuskey D., McCutcheon R.A., Nutt D.J., Pariante C., Pillinger T., Radhakrishnan R., Rucker J., Selvaraj S., Stokes P., Upthegrove R., Yalin N., Yatham L., Young A.H.,

- Zahn R., Cowen P.J. (2023) A leaky umbrella has little value: evidence clearly indicates the serotonin system is implicated in depression. *Mol Psychiatry* doi: 10.1038/s41380-023-02095-y.
- Kaul, Alkayed, Nagarajan, Cianciulli, Micheli, Semeraro, Trist. Oregon Health & Science University. Antagonists of GPR39 protein. European Patent Office. Oregon Health & Science University. Antagonists of GPR39 protein. European Patent Office. Patent WO/2021/222858.  
[https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021222858&\\_cid=P21-LCN8K7-44713-1](https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021222858&_cid=P21-LCN8K7-44713-1). Eugenics Review . 2021.
- Ref Type: Patent
- Khalil A., Shekh-Ahmad T., Kovac S., Wykes R.C., Horgen F.D., Fleig A., Walker M.C. (2023) Drugs acting at TRPM7 channels inhibit seizure-like activity. *Epilepsia Open*10.
- Khan M.Z. (2016) A possible significant role of zinc and GPR39 zinc sensing receptor in Alzheimer disease and epilepsy. *Biomed Pharmacother* 79:263-272.
- Kolakowski L.F., Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept Channels* 2:1-7.
- Laitakari A., Liu L., Frimurer T.M., Holst B. (2021) The zinc-sensing receptor GPR39 in physiology and as a pharmacological target. *Int J Mol Sci* 22:3872.
- Lauwers E., Landuyt B., Arckens L., Schoofs L., Luyten W. (2006) Obestatin does not activate orphan G protein-coupled receptor GPR39. *Biochem Biophys Res Commun* 351:21-25.
- Liao H., Gao W., Ma J., Xue H., Wang Y., Huang D., Yan F., Ye Y. (2021) GPR39 promotes cardiac hypertrophy by regulating the AMPK-mTOR pathway and protein synthesis. *Cell Biol Int* 45:1211-1219.
- Lopez-Solis L., Companys E., Puy J., Blindauer C.A., Galceran J. (2022) Direct determination of free Zn concentration in samples of biological interest. *Anal Chim Acta* 1229:340195.
- Maret W. (2001) Crosstalk of the group IIa and IIb metals calcium and zinc in cellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12325-12327.
- Meda Venkata S.P., Li H., Xu L., Koh J.Y., Nguyen H., Minjares M., Li C., Kowluru A., Milligan G., Wang J.M. (2023) Inhibition of GPR39 restores defects in endothelial cell-mediated neovascularization under the duress of chronic hyperglycemia: Evidence for regulatory roles of the sonic hedgehog signaling axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120:e2208541120.
- Methner C., Cao Z., Mishra A., Kaul S. (2021) Mechanism and potential treatment of the "no reflow" phenomenon after acute myocardial infarction: role of pericytes and GPR39. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 321:H1030-H1041.
- Mlyniec K., Doboszewska U., Szewczyk B., Sowa-Kucma M., Misztak P., Piekoszewski W., Trela F., Ostachowicz B., Nowak G. (2014) The involvement of the GPR39-Zn<sup>2+</sup>-sensing receptor in the pathophysiology of depression. Studies in rodent models and suicide victims. *Neuropharmacology* 79:290-297.
- Mo F., Tang Y., Du P., Shen Z., Yang J., Cai M., Zhang Y., Li H., Shen H. (2020) GPR39 protects against corticosterone-induced neuronal injury in hippocampal cells through the CREB-BDNF signaling pathway. *J Affect Disord* 272:474-484.

- Moncrieff J., Cooper R.E., Stockmann T., Amendola S., Hengartner M.P., Horowitz M.A. (2022) The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. *Mol Psychiatry* doi: 10.1038/s41380-022-01661-0.
- Ngugi A.K., Bottomley C., Kleinschmidt I., Sander J.W., Newton C.R. (2010) Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia* 51:883-890.
- Peukert S., Hughes R., Nunez J., He G., Yan Z., Jain R., Llamas L., Luchansky S., Carlson A., Liang G., Kunjathoor V., Pietropaolo M., Shapiro J., Castellana A., Wu X., Bose A. (2014) Discovery of 2-pyridylpyrimidines as the first orally bioavailable GPR39 agonists. *ACS Med Chem Lett* 5:1114-1118.
- Ribeiro J.D., Huang X., Fox K.R., Franklin J.C. (2018) Depression and hopelessness as risk factors for suicide ideation, attempts and death: meta-analysis of longitudinal studies. *Br J Psychiatry* 212:279-286.
- Sato S., Huang X.P., Kroeze W.K., Roth B.L. (2016) Discovery and characterization of novel GPR39 agonists allosterically modulated by zinc. *Mol Pharmacol* 90:726-737.
- Simonato M., Tongiorgi E., Kokaia M. (2006) Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 27:631-638.
- Sriram K., Insel P.A. (2018) G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: how many targets and how many drugs? *Mol Pharmacol* 93:251-258.
- Staley K. (2015) Molecular mechanisms of epilepsy. *Nat Neurosci* 18:367-372.
- Steinborn C., Huber T., Lichtenegger J., Plangger I., Wurst K., Magauer T. (2023) Total syntheses of (+)-waixenicin A, (+)-9-deacetoxy-14,15-deepoxyxeniculin, and (-)-xenifaraunol A. *J Am Chem Soc* 145:11811-11817.
- Sunuwar L., Asraf H., Donowitz M., Sekler I., Hershinkel M. (2017) The Zn<sup>2+</sup>-sensing receptor, ZnR/GPR39, upregulates colonocytic Cl<sup>-</sup> absorption, via basolateral KCC1, and reduces fluid loss. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863:947-960.
- Szewczyk B., Szopa A., Serefko A., Poleszak E., Nowak G. (2018) The role of magnesium and zinc in depression: similarities and differences. *Magnes Res* 31:78-89.
- te Velthuis A.J., van den Worm S.H., Sims A.C., Baric R.S., Snijder E.J., van Hemert M.J. (2010) Zn<sup>2+</sup> inhibits coronavirus and arterivirus RNA polymerase activity in vitro and zinc ionophores block the replication of these viruses in cell culture. *PLoS Pathog* 6:e1001176.
- Thom M. (2014) Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40:520-543.
- Trivedi M.H., Rush A.J., Wisniewski S.R., Nierenberg A.A., Warden D., Ritz L., Norquist G., Howland R.H., Lebowitz B., McGrath P.J., Shores-Wilson K., Biggs M.M., Balasubramani G.K., Fava M. (2006) Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry* 163:28-40.
- van Loo K.M., Schaub C., Pitsch J., Kulbida R., Opitz T., Ekstein D., Dalal A., Urbach H., Beck H., Yaari Y., Schoch S., Becker A.J. (2015) Zinc regulates a key transcriptional pathway for epileptogenesis via metal-regulatory transcription factor 1. *Nat Commun* 6:8688.



- Vergnano A.M., Rebola N., Savtchenko L.P., Pinheiro P.S., Casado M., Kieffer B.L., Rusakov D.A., Mülle C., Paoletti P. (2014) Zinc dynamics and action at excitatory synapses. *Neuron* 82:1101-1114.
- Wacker D., Stevens R.C., Roth B.L. (2017) How ligands illuminate GPCR molecular pharmacology. *Cell* 170:414-427.
- Wang B., Wu L., Chen J., Dong L., Chen C., Wen Z., Hu J., Fleming I., Wang D.W. (2021) Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther* 6:94.
- Wasilevska I., Gupta R.K., Wojtas B., Palchevska O., Kuznicki J. (2020) *stim2b* knockout induces hyperactivity and susceptibility to seizures in zebrafish larvae. *Cells* 9:1285.
- Yasuda S., Miyazaki T., Munechika K., Yamashita M., Ikeda Y., Kamizono A. (2007) Isolation of Zn<sup>2+</sup> as an endogenous agonist of GPR39 from fetal bovine serum. *J Recept Signal Transduct Res* 27:235-246.
- Zhang J.V., Ren P.G., Avsian-Kretchmer O., Luo C.W., Rauch R., Klein C., Hsueh A.J. (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310:996-999.
- Zou R., Wang X., Li S., Chan H.C.S., Vogel H., Yuan S. (2022) The role of metal ions in G protein-coupled receptor signalling and drug discovery. *WIREs Comput Mol Sci* 12:e1565.

#### 4.4. Inne osiągnięcie

##### Rola niedoboru cynku w depresji

Prace zespołu pod kierownictwem Prof. Gabriela Nowaka w Instytucie Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, prowadzone we współpracy z Katedrą i Kliniką Psychiatrii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium-Medicum wykazały przeciwdepresyjne właściwości cynku w aspekcie jego działania w zwierzęcych testach i modelach depresji oraz w aspekcie pozytywnych efektów suplementacji cynkiem terapii przeciwdepresyjnej u pacjentów. Przyczynkiem do realizacji pracy doktorskiej były wyniki badań epidemiologicznych wskazujących na związek pomiędzy zmniejszeniem podaży cynku i rozwojem depresji u ludzi oraz dane z badań przedklinicznych sugerujące, że ograniczenie zawartości cynku w diecie zwierząt doświadczalnych powoduje behawioralne symptomy choroby. Biorąc pod uwagę udział układu glutaminianergicznego, a szczególnie NMDAR, w patofizjologii zaburzeń depresyjnych i w mechanizmie działania cynku, w pracy doktorskiej zbadano, czy dieta o zmniejszonej zawartości tego pierwiastka wywołuje zachowanie przypominające depresję oraz zmiany w obrębie szlaku białek związanych z NMDAR

w strukturach mózgu powiązanych z etiopatogenezą choroby (hipokamp, kora przedczołowa), a także wpływ chronicznych podań standardowego leku przeciwdepresyjnego na powstałe zmiany w zachowaniu i zmiany neurobiologiczne. Wykazano, że ograniczenie podaży cynku powoduje u szczurów zmiany behawioralne naśladujące objawy depresji, którym towarzyszą zmiany w ekspresji białek szlaku NMDAR w strukturach mózgu ważnych dla etiopatogenezy depresji. Uzyskane wyniki sugerują podobieństwo modelu deficytu cynku do depresji w zakresie objawów i neurobiologii.

**Doboszevska U**, Sowa-Kućma M, Młyniec K, Pochwat B, Hołuj M, Ostachowicz B, Pilc A, Nowak G, Szewczyk B. Zinc deficiency in rats is associated with up-regulation of hippocampal NMDA receptor. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015;56:254-63. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.09.013. [MNiSW<sub>2015</sub>=35](#), [IF<sub>2015</sub>=4.361](#)

**Doboszevska U\***, Szewczyk B, Sowa-Kućma M, Młyniec K, Rafał A, Ostachowicz B, Lankosz M, Nowak G. Antidepressant activity of fluoxetine in the zinc deficiency model in rats involves the NMDA receptor complex. *Behav Brain Res*. 2015;287:323-30. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.064. [MNiSW<sub>2015</sub>=30](#), [IF<sub>2015</sub>=3.002](#)

**Doboszevska U\***, Szewczyk B, Sowa-Kućma M, Noworyta-Sokołowska K, Misztak P, Gołębiowska J, Młyniec K, Ostachowicz B, Krośniak M, Wojtanowska-Krośniak A, Gołombiowska K, Lankosz M, Piekoszewski W, Nowak G. Alterations of Bio-elements, Oxidative, and Inflammatory Status in the Zinc Deficiency Model in Rats. *Neurotox Res*. 2016;29(1):143-54. doi: 10.1007/s12640-015-9571-7. [MNiSW<sub>2016</sub>=25](#), [IF<sub>2016</sub>=2.942](#)

#### 4.5. Pozostałe kierunki badań

##### *Inne badania związane z sygnalizacją cynkiem:*

##### Przeciwdepresyjne i przeciwłękowe działanie cynku i magnezu

W okresie realizacji pracy doktorskiej w Instytucie Farmakologii Polskiej Akademii Nauk uczestniczyłam w badaniach dotyczących działania przeciwdepresyjnego i przeciwłękowego cynku. Wykazano również działanie przeciwdepresyjne innego antagonisty NMDAR, magnezu, w modelu chronicznego łagodnego stresu. Model ten odzwierciedla anhedonię, czyli niezdolność do odczuwania przyjemności, która jest jednym z osiowych objawów depresji. Ponadto wykazane zmiany w ekspresji białek podjednostek receptora NMDA w strukturach mózgu (hipokamp, ciało migdałowe) po przeprowadzeniu procedury chronicznego

łagodnego stresu i po podaniach magnezu, sugerują udział receptorów NMDA w patofizjologii anhedonii i w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania magnezu w tym modelu. Badania dotyczące udziału cynku i magnezu w depresji i lęku zostały podsumowane w pracach przeglądowych i w rozdziale w książce wydawnictwa Elsevier.

Partyka A, Jastrzębska-Więsek M, Szewczyk B, Stachowicz K, Sławińska A, Poleszak E, **Doboszevska U**, Pilc A, Nowak G. Anxiolytic-like activity of zinc in rodent tests. *Pharmacol Rep.* 2011;63(4):1050-5. doi: 10.1016/s1734-1140(11)70621-1. [MNiSW<sub>2011</sub>=25](#), [IF<sub>2011</sub>=2.445](#)

Pochwat B, Szewczyk B, Sowa-Kucma M, Siwek A, **Doboszevska U**, Piekoszewski W, Gruca P, Papp M, Nowak G. Antidepressant-like activity of magnesium in the chronic mild stress model in rats: alterations in the NMDA receptor subunits. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014 Mar;17(3):393-405. doi: 10.1017/S1461145713001089. [MNiSW<sub>2014</sub>=40](#), [IF<sub>2014</sub>=4.009](#)

Młyniec K, Gaweł M, **Doboszevska U**, Starowicz G, Pytka K, Davies CL, Budziszewska B. Essential elements in depression and anxiety. Part II. *Pharmacol Rep.* 2015 Apr;67(2):187-94. doi: 10.1016/j.pharep.2014.09.009. [MNiSW<sub>2015</sub>=25](#), [IF<sub>2015</sub>=2.251](#)

Młyniec K, Gaweł M, **Doboszevska U**, Starowicz G, Nowak G. The Role of Elements in Anxiety. *Vitam Horm.* 2017;103:295-326. doi: 10.1016/bs.vh.2016.09.002. [MNiSW<sub>2017</sub>=20](#), [IF<sub>2017</sub>=3.286](#)

### GPR39 jako cel dla leków przeciwdepresyjnych

Pracując na stanowisku *post-doc* na Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium-Medicum uczestniczyłam w badaniach na temat GPR39 jako celu dla nowych, szybko działających leków przeciwdepresyjnych. Opracowanie leków przeciwdepresyjnych o szybkim początku działania stanie się przełomem w leczeniu depresji, ponieważ wszystkie dostępne leki z tej grupy cechują się działaniem klinicznym występującym z kilkutygodniowym opóźnieniem, co stanowi istotny problem dla pacjentów. Praca w tym zespole, pod kierownictwem Prof. Katarzyny Młyniec, stanowiła kontynuację współpracy rozpoczętej w okresie studiów doktoranckich. Wykonane wówczas doświadczenia z wykorzystaniem modeli depresji - usunięcia opuszek węchowych i proponowanego modelu depresji - deficytu cynku oraz pośmiertne oznaczenia w tkankach mózgowych samobójców wskazały na udział GPR39 w patofizjologii chorób neuropsychiatrycznych i stanowiły przyczynek do dalszych badań nad GPR39.

Mlyniec K, Siodlak D, **Doboszevska U**, Nowak G. GPCR oligomerization as a target for antidepressants: Focus on GPR39. *Pharmacol Ther.* 2021;225:107842. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107842. [MEiN<sub>2021</sub>=200](#), [IF<sub>2021</sub>=13.400](#)

Mlyniec K, **Doboszevska U**, Szewczyk B, Sowa-Kucma M, Misztak P, Piekoszevski, W, Trela F, Ostachowicz B, Nowak G. The involvement of the GPR39-Zn(2+)-sensing receptor in the pathophysiology of depression. Studies in rodent models and suicide victims. *Neuropharmacology.* 2014 Apr;79:290-7. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.001. [MNiSW<sub>2014</sub>=40](#), [IF<sub>2014</sub>=3.049](#)

### GPR39 jako cel dla nowych leków w różnych obszarach terapeutycznych:

**Doboszevska U**, Maret W, Wlaz P. GPR39 – an orphan receptor begging for ligands. *Drug Discovery Today* (artykuł na zaproszenie, w recenzji)

**Doboszevska U**, Maret W, Wlaz P. GPR39 deorphanization: The long and winding road to eicosanoids and a crosstalk between GPR39 and hedgehog signaling in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 Jul 11;120(28):e2308227120. doi: 10.1073/pnas.2308227120. [MEiN<sub>2023</sub>=200](#), [IF<sub>2022</sub>=11.1](#)

Powyższe publikacja i list do czasopisma *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* są efektem dyskusji prowadzonych w trakcie wizyt naukowych w *King's College London* z Prof. Wolfgangiem Maretem, które odbyłam jako pracownik Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium-Medicum. W 2001 r. Prof. Maret napisał list do czasopisma *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* zatytułowany "Crosstalk of the group IIa and IIb metals calcium and zinc in cellular signaling", w którym przedstawił wątpliwości dotyczące stanu wiedzy uprawniającego do stwierdzenia istnienia GPCR, którego endogennym agonistą są jony cynku (Maret, 2001). Receptor ten został później zidentyfikowany jako GPR39. Publikacja zawiera spostrzeżenia, które wyniknęły z realizacji badań przedstawionych w publikacjach **P2-P4** na temat syntetycznego liganda GPR39, a list odnosi się do kwestii proponowanych naturalnych ligandów.

W liście do czasopisma *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* z 2023 r., dotyczącym publikacji (Meda Venkata i wsp., 2023) przedstawiono model roboczy, w którym efekty opisane przez autorów, tj. wpływ na angiogenezę, mogą być wytłumaczone działaniem ostatnio zaproponowanych endogennych ligandów GPR39: 15-HETE i 14,15-EET (Alkayed i wsp., 2022). Badanie funkcji tych eikozanoidów w regulacji sygnalizacji GPR39 w komórkach śródbłonna i innych typach komórek będzie stanowiło przedmiot moich dalszych badań. Mam nadzieję, że wywód rozpoczęty na łamach *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* na zasadzie logicznego wnioskowania będzie kontynuowany w

pracy laboratoryjnej, a przez to przyczyni się do postępu w dziedzinie nauk podstawowych, a w dalszej perspektywie do możliwości wykorzystania receptora, nad którym pracowałam przez kilka ostatnich lat, jako celu dla nowych leków.

### Sygnalizacja cynkiem w COVID-19

**Doboszevska U**, Wlaz P, Nowak G, Mlyniec K. Targeting zinc metalloenzymes in COVID-19. *British Journal of Pharmacology*, 2020, 177(21):4887-4898. doi: 10.1111/bph.15199. MNiSW<sub>2019</sub>=140, IF<sub>2020</sub>=8.739

Publikacja powstała w trakcie pracy na Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium-Medicum podczas pandemii COVID-19, kiedy wysiłki naukowców na całym świecie koncentrowały się na opracowaniu strategii walki z SARS-CoV-2. Mimo, że sytuację udało się opanować dzięki stworzeniu szczepionek, wciąż potrzebne są leki, które będą mogły zostać podane osobom, które nie mogą poddać się szczepieniu lub zachorują mimo szczepienia. Brak przeprowadzenia badań klinicznych nad nowymi lekami podczas pandemii SARS i MERS spowodował, że początkowo brak było leków celujących w zbliżone do siebie wirusy SARS-CoV i SARS-CoV-2. Artykuł „*Targeting zinc metalloenzymes in COVID-19*” przedstawia pomysł walki z SARS-CoV-2 poprzez unieczynnienie metaloenzymu wirusa (proteazy papaino-podobnej, ang. *papain-like protease*, PL<sup>pro</sup>), która jest niezbędna dla jego replikacji, przez usunięcie z niej cynku, który pełni funkcję strukturalną, a następnie uwolnienie jonów cynku do sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Uwolnione jony cynku mogą m.in. hamować inny enzym: polimerazę RNA zależną od RNA (ang. *RNA dependent RNA polymerase*, RdRp), co wykazano eksperymentalnie dla SARS-CoV (te Velthuis i wsp., 2010).

### Pozostałe badania z obszaru neurofarmakologii depresji, lęku i padaczki:

W trakcie stażu podoktorskiego na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie miałam okazję uczestniczyć w głównych kierunkach badań zespołu pod kierownictwem Prof. Piotra Wlazia, który specjalizuje się w epileptologii przedklinicznej. Obejmują one wykonywanie testów i modeli drgawek ostrych i padaczki u gryzoni, a ostatnio także wykorzystanie modelu *Danio rerio* do badań neurofarmakologicznych. Dzięki temu mogłam zaznajomić się z metodyką, które została wykorzystana w publikacjach **P2-P4**.

### Wykorzystanie zwierzęcych modeli drgawek i padaczki

Socła K, Nieoczym D, Pieróg M, Wyska E, Szafarz M, **Doboszevska U**, Właż P. Effect of Tadalafil on Seizure Threshold and Activity of Antiepileptic Drugs in Three Acute Seizure Tests in Mice. *Neurotox Res.* 2018 Oct;34(3):333-346. doi: 10.1007/s12640-018-9876-4. [MNiSW<sub>2018</sub>=25](#), [IF<sub>2018</sub>=3.311](#)

Socła K, Mogilski S, Pieróg M, Nieoczym D, Abram M, Szulczyk B, Lubelska A, Latacz G, **Doboszevska U**, Właż P, Kamiński K. KA-11, a Novel Pyrrolidine-2,5-dione Derived Broad-Spectrum Anticonvulsant: Its Antiepileptogenic, Antinociceptive Properties and in Vitro Characterization. *ACS Chem Neurosci.* 2019 Jan 16;10(1):636-648. doi: 10.1021/acchemneuro.8b00476. [MNiSW<sub>2019</sub>=100](#), [IF<sub>2019</sub>=4.486](#)

Socła K, **Doboszevska U**, Właż P. Salvinorin A Does Not Affect Seizure Threshold in Mice. *Molecules.* 2020 Mar 7;25(5):1204. doi: 10.3390/molecules25051204. [MNiSW<sub>2019</sub>=100](#), [IF<sub>2020</sub>=4.411](#)

### Wykorzystanie modelu *Danio rerio* do badania leków przeciwlękowych i przeciwdrgawkowych

Pieróg M, Guz L, **Doboszevska U**, Poleszak E, Właż P. Effects of alprazolam treatment on anxiety-like behavior induced by color stimulation in adult zebrafish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018 Mar 2;82:297-306. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.08.025. [MNiSW<sub>2018</sub>=35](#), [IF<sub>2018</sub>=4.315](#)

Pieróg M, Socła K, **Doboszevska U**, Wyska E, Guz L, Szopa A, Serefko A, Poleszak E, Właż P. Effects of new antiseizure drugs on seizure activity and anxiety-like behavior in adult zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021;15;427:115655. doi: 10.1016/j.taap.2021.115655. [MEiN<sub>2021</sub>=140](#), [IF<sub>2021</sub>=4.460](#)

Pieróg M, Socła K, **Doboszevska U**, Wyska E, Guz L, Szopa A, Serefko A, Poleszak E, Właż P. Effects of classic antiseizure drugs on seizure activity and anxiety-like behavior in adult zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021;415:115429. doi: 10.1016/j.taap.2021.115429. [MEiN<sub>2021</sub>=140](#), [IF<sub>2021</sub>=4.460](#)

### Rola mikrobioty jelitowej w padaczce i depresji

Socła K, **Doboszevska U**, Szopa A, Serefko A, Włodarczyk M, Zielińska A, Poleszak E, Fichna J, Właż P. The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Res.* 2021 172:105840. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105840. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105840. [MEiN<sub>2021</sub>=100](#), [IF<sub>2021</sub>=10.334](#)

Praca na temat mikrobioty powstała w związku ze stażem podoktorskim na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej i stanowiła przyczynek do obrania nowych kierunków badań, które były realizowane w Zakładzie Fizjologii Zwierząt i Farmakologii już po zakończeniu przeze mnie stażu. **Artykuł znajduje się w 1% najczęściej cytowanych prac z dziedziny farmakologii/toksykologii w 2023 r., według bazy Web of Science.**

### Rola receptorów serotoninowych 5-HT<sub>6</sub> w leczeniu padaczki

W trakcie stażu podoktorskiego wykonywałam także badania naukowe we współpracy z międzynarodowym zespołem składającym się z naukowców z Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum, pod kierownictwem Prof. Pawła Zajdla oraz Instytutu Genomiki Funkcjonalnej Inserm/CNRS w Montpellier, pod kierownictwem Prof. Philippe Marin, których celem jest ocena aktywności przeciwdrgawkowej antagonistów receptora 5-HT<sub>6</sub>. Praca w tym zespole może przyczynić się nie tylko do opisanie nowego mechanizmu leżącego u podłoża działania przeciwdrgawkowego (udział aktywności konstytutywnej i selektywności funkcjonalnej receptora 5-HT<sub>6</sub>), ale również do wskazania konkretnych związków o takim działaniu, ma więc charakter aplikacyjny.

Brałam też udział w badaniach prowadzonych we współpracy z Katedrą Farmacji Stosowanej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, gdzie realizowano następujące kierunki badań:

### Receptory adenozynowe jako cel w leczeniu depresji

Szopa A, Socała K, Serefko A, **Doboszevska U**, Wróbel A, Poleszak E, Właż P. Purinergic transmission in depressive disorders. *Pharmacol Ther.* 2021;224:107821. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107821. [MEiN<sub>2021</sub>=200](#), [IF<sub>2021</sub>=13.400](#)

Szopa A, Poleszak E, Bogatko K, Wyska E, Wośko S, **Doboszevska U**, Świąder K, Właż A, Dudka J, Wróbel A, Właż P, Serefko A. DPCPX, a selective adenosine A1 receptor antagonist, enhances the antidepressant-like effects of imipramine, escitalopram, and reboxetine in mice behavioral tests. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018 Dec;391(12):1361-1371. doi: 10.1007/s00210-018-1551-z. [MNiSW<sub>2018</sub>=25](#), [IF<sub>2018</sub>=2.058](#)

Bogatko K, Poleszak E, Szopa A, Wyska E, Właż P, Świąder K, Właż A, **Doboszevska U**, Rojek K, Serefko A. The influence of selective A1 and A2A receptor antagonists on the antidepressant-like activity of moclobemide, venlafaxine and bupropion in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2018 Sep;70(9):1200-1208. doi: 10.1111/jphp.12954. [MNiSW<sub>2018</sub>=25](#), [IF<sub>2018</sub>=2.390](#)

Szopa A, Bogatko K, Serefko A, Wyska E, Wośko S, Świąder K, **Doboszevska U**, Właż A, Wróbel A, Właż P, Dudka J, Poleszak E. Agomelatine and tianeptine antidepressant activity in mice behavioral despair tests is enhanced by DMPX, a selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist, but not DPCPX, a selective adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist. *Pharmacol Rep.* 2019 Aug;71(4):676-681. doi: 10.1016/j.pharep.2019.03.007. [MNiSW<sub>2019</sub>=70](#), [IF<sub>2019</sub>=2.754](#)

Poleszak E, Szopa A, Bogatko K, Wyska E, Wośko S, Świąder K, **Doboszevska U**, Właż A, Wróbel A, Właż P, Serefko A. Antidepressant-Like Activity of Typical Antidepressant Drugs in the Forced Swim Test and Tail Suspension Test in Mice Is Augmented by DMPX, an Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Antagonist. *Neurotox Res.* 2019 Feb;35(2):344-352. doi: 10.1007/s12640-018-9959-2. [MNiSW<sub>2019</sub>=70](#), [IF<sub>2019</sub>=2.992](#)

#### Układ endokannabinoidowy jako cel w leczeniu depresji

Poleszak E, Wośko S, Sławińska K, Wyska E, Szopa A, **Doboszevska U**, Właż P, Właż A, Dudka J, Szponar J, Serefko A. Influence of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors on the activity of the monoaminergic system in the behavioural tests in mice. *Brain Res Bull.* 2019 Aug;150:179-185. 10.1016/j.brainresbull.2019.05.021. [MNiSW<sub>2019</sub>=100](#), [IF<sub>2019</sub>=3.370](#)

Poleszak E, Wośko S, Sławińska K, Wyska E, Szopa A, Sobczyński J, Wróbel A, **Doboszevska U**, Właż P, Właż A, Szponar J, Skąlecki P, Serefko A. Ligands of the CB<sub>2</sub> cannabinoid receptors augment activity of the conventional antidepressant drugs in the behavioural tests in mice. *Behav Brain Res.* 2020 Jan 27;378:112297. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112297. [MNiSW<sub>2019</sub>=100](#), [IF<sub>2020</sub>=3.332](#)

Poleszak E, Wośko S, Sławińska K, Wyska E, Szopa A, Świąder K, Wróbel A, Szponar J, **Doboszevska U**, Właż P, Właż A, Serefko A. Influence of the endocannabinoid system on the antidepressant activity of bupropion and moclobemide in the behavioural tests in mice. *Pharmacol Rep.* 2020 Mar 27. doi: 10.1007/s43440-020-00088-0. doi: 10.1007/s43440-020-00088-0. [MNiSW<sub>2019</sub>=70](#), [IF<sub>2020</sub>=3.024](#)

#### Wpływ kofeiny na działanie leków przeciwdepresyjnych

Szopa A, **Doboszevska U**, Herbet M, Wośko S, Wyska E, Świąder K, Serefko A, Korga A, Właż A, Wróbel A, Ostrowska M, Terlecka J, Kanadys A, Poleszak E, Dudka J, Właż P. Chronic treatment with caffeine and its withdrawal modify the antidepressant-like activity of selective serotonin reuptake inhibitors in the forced swim and tail suspension tests in mice. Effects on Comt, Slc6a15 and Adora1 gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017 Dec 15;337:95-103. doi: 10.1016/j.taap.2017.10.020. [MNiSW<sub>2017</sub>=40](#), [IF<sub>2018</sub>=3.585](#)

Szopa A\*, Poleszak E, **Doboszevska U\***, Herbet M, Świąder K, Wyska E, Serefko A, Właż A, Korga A, Ostrowska M, Juś P, Jedynak S, Dudka J, Właż P. Withdrawal of caffeine after its chronic administration modifies the antidepressant-like activity of atypical antidepressants in mice. Changes in cortical expression of Comt, Slc6a15 and Adora1 genes. *Psychopharmacology (Berl).* 2018 Aug;235(8):2423-2434. doi: 10.1007/s00213-018-4940-6. [MNiSW<sub>2018</sub>=35](#), [IF<sub>2018</sub>=3.424](#)

Do badań wybranych układów neuroprzekaźnikowych wykorzystywano zwierzęce testy do wykrywania działania przeciwdepresyjnego: test wymuszonego pływania, zawieszenia za ogon, spontanicznej aktywności lokomotorycznej i metody biologii molekularnej.

Uczestniczyłam również w badaniach prowadzonych we współpracy z II Katedrą i Kliniką Ginekologii w Lublinie na temat:



Poszukiwanie nowych możliwości leczenia pęcherza nadreaktywnego, o potencjalnie korzystnym działaniu przy współistniejącej depresji

Wróbel A\*, **Doboszevska U\***, Rechberger E, Wlaż P, Rechberger T. SN003, a CRF<sub>1</sub> receptor antagonist, attenuates depressive-like behavior and detrusor overactivity symptoms induced by 13-cis-retinoic acid in rats. *Eur J Pharmacol.* 2017 Oct 5;812:216-224. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.07.010. [MNiSW<sub>2017</sub>=30](#), [IF<sub>2017</sub>=3.040](#)

Wróbel A, **Doboszevska U**, Rechberger E, Rojek K, Serefko A, Poleszak E, Skalicka-Woźniak K, Dudka J, Wlaż P. Rho kinase inhibition ameliorates cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2017 Jun;390(6):613-619. doi: 10.1007/s00210-017-1361-8. [MNiSW<sub>2017</sub>=25](#), [IF<sub>2017</sub>=2.238](#)

Wróbel A\*, **Doboszevska U\***, Rechberger E, Bańczerowska-Górska M, Czuczwar P, Poleszak E, Dudka J, Wlaż P, Miotła P, Wlaźlak E, Rechberger T. Blebbistatin, a Myosin II Inhibitor, Exerts Antidepressant-Like Activity and Suppresses Detrusor Overactivity in an Animal Model of Depression Coexisting with Overactive Bladder. *Neurotox Res.* 2019 Jan;35(1):196-207. doi: 10.1007/s12640-018-9948-5. [MNiSW<sub>2019</sub>=70](#), [IF<sub>2019</sub>=2.992](#)

Wróbel A\*, Nowakowski Ł, **Doboszevska U\***, Rechberger E, Bańczerowska-Górska M, Wlaźlak E, Zakrocka I, Wlaż P, Semczuk A, Dudka J, Poleszak E. Blebbistatin reveals beneficial effects on the cystometric parameters in an animal model of detrusor overactivity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2019 Jul;392(7):843-850. doi: 10.1007/s00210-019-01640-3. [MNiSW<sub>2019</sub>=70](#), [IF<sub>2019</sub>=2.050](#)

Doświadczenia dotyczące nowych opcji leczenia farmakologicznego pęcherza nadreaktywnego prowadzone były w oparciu o modele zwierzęce. Poszukiwano związków o dodatkowym działaniu przeciwdepresyjnym, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu pęcherza nadreaktywnego współistniejącego z depresją.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

### 5.1. University of Strathclyde

Pracę badawczą rozpoczęłam w Wielkiej Brytanii już w trakcie studiów magisterskich. Odbyłam wtedy czteromiesięczny staż w Instytucie Badania Leków na Uniwersytecie Strathclyde (*Strathclyde Insititue for Drug Research, Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Strathclyde*) w Glasgow, w Szkocji, w ramach programu LLP-Erasmus. Moim opiekunem był Prof. Alan Harvey. Uczestniczyłam w dwóch projektach badawczych:

- Poszukiwanie antagonistów receptorów adenozynowych  $A_{2A}$  jako struktur wiodących w projektowaniu leków o potencjalnym działaniu neuroprotekcijnym w udarze niedokrwiennym mózgu
- Wykorzystanie produktów naturalnych w badaniach przesiewowych potencjalnych leków przeciwnowotworowych (projekt prowadzony we współpracy z *Cancer Research UK*)

W ramach pobytu na stypendium Erasmus zaznajamiałam się z metodami *in vitro*.

### 5.2. Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk

Po powrocie ze stypendium Erasmus rozpoczęłam Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie "Nauki Molekularne dla Medycyny" (Mol-Med) (projekt POKL.04.01.01-00-056/10, współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego – Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007 – 2013). W projekcie uczestniczyły cztery jednostki partnerskie, a każdy doktorant realizował pracę doktorską w dwóch. W moim przypadku były to Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, gdzie uzyskałam stopień doktora nauk medycznych oraz Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Tematem mojej pracy doktorskiej była „Ocena neurobiologiczna i farmakologiczna deficytu cynku jako modelu depresji”. Moimi promotorami byli: Prof. Gabriel Nowak (z ramienia Instytutu Farmakologii PAN) i Prof. Wojciech Piekoszewski (z ramienia Wydziału Chemii UJ). Byłam też stypendystką projektu „Doctus” Małopolski Fundusz Stypendialny dla Doktorantów, finansowanego przez Europejski Fundusz Społeczny Program Operacyjny Kapitał Ludzki. Mój doktorat

był również współfinansowany z zadania 3.2. projektu POIG.01.01.02-12-004/09-00 Depresja-Mechanizmy-Terapia (De-Me-Ter) w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka. Uczestniczyłam także w badaniach objętych działalnością statutową Zakładu Neurobiologii Instytutu Farmakologii PAN.

Współpracowałam z następującymi jednostkami naukowymi:

- Akademią Górniczo-Hutniczą im. Stanisława Staszica w Krakowie, Katedrą Fizyki Medycznej i Biofizyki (Prof. Markiem Lankoszem, dr Beatą Ostachowicz), (współpraca w ramach projektów Mol-Med i De-Me-Ter)
- Uniwersytetem Jagiellońskim Collegium-Medicum, Zakładem Bromatologii (dr hab. Mirosławem Krośniakiem, mgr farm. Agnieszką Wojtanowską-Krośniak), (współpraca w ramach projektu Mol-Med)
- Zakładem Farmakologii Instytutu Farmakologii PAN (Prof. Krystyną Gołombiowską, dr Karoliną Noworytą, dr Anną Górską (współpraca w ramach projektu Mol-Med)
- Zakładem Badań Nowych Leków Instytutu Farmakologii PAN (dr Małgorzatą Hołój) (współpraca w ramach projektu Mol-Med)
- Narodowym Instytutem Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie w Gliwicach, Pracownią Proteomiki Klinicznej (współpraca w ramach projektu Mol-Med., nauka metody badawczej MALDI-TOF wraz z dr Martą Gawin z Wydziału Chemii UJ)

Poniżej podaję publikację będące efektem realizacji doświadczeń w Instytucie Farmakologii PAN, związane z prowadzonymi tam kierunkami badań:

Deficyt cynku jako model depresji/ rola niedoboru cynku w depresji:

**Doboszevska U**, Sowa-Kućma M, Młyniec K, Pochwat B, Hołuj M, Ostachowicz B, Pilc A, Nowak G, Szewczyk B. Zinc deficiency in rats is associated with up-regulation of hippocampal NMDA receptor. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015;56:254-63. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.09.013. [MNI<sub>2015</sub>=35](#), [IF<sub>2015</sub>=4.361](#)

**Doboszevska U\***, Szewczyk B, Sowa-Kućma M, Młyniec K, Rafał A, Ostachowicz B, Lankosz M, Nowak G. Antidepressant activity of fluoxetine in the zinc deficiency model in rats involves the NMDA receptor complex. *Behav Brain Res*. 2015;287:323-30. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.064. [MNI<sub>2015</sub>=30](#), [IF<sub>2015</sub>=3.002](#)

**Doboszevska U\***, Szewczyk B, Sowa-Kućma M, Noworyta-Sokołowska K, Misztak P, Gołębiowska J, Młyniec K, Ostachowicz B, Krośniak M, Wojtanowska-Krośniak A, Gołombiowska K, Lankosz M, Piekoszevski W, Nowak G. Alterations of Bio-elements, Oxidative, and Inflammatory Status in the Zinc Deficiency Model in Rats. *Neurotox Res.* 2016;29(1):143-54. doi: 10.1007/s12640-015-9571-7. [MNiSW<sub>2016</sub>=25](#), [IF<sub>2016</sub>=2.942](#)

Depciuch J, Sowa-Kućma M, Nowak G, Szewczyk B, **Doboszevska U**, Parlinska- Wojtan M. The role of zinc deficiency-induced changes in the phospholipid-protein balance of blood serum in animal depression model by Raman, FTIR and UV-vis spectroscopy. *Biomed Pharmacother.* 2017;89:549-558. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.180. [MNiSW<sub>2017</sub>=25](#), [IF<sub>2017</sub>=3.457](#)

Młyniec K, Davies CL, Budziszewska B, Opoka W, Reczyński W, Sowa-Kućma M, **Doboszevska U**, Pilc A, Nowak G. Time course of zinc deprivation-induced alterations of mice behavior in the forced swim test. *Pharmacol Rep.* 2012;64(3):567-75. doi: 10.1016/s1734-1140(12)70852-6. [MNiSW<sub>2012</sub>=25](#), [IF<sub>2012</sub>=1.965](#)

Młyniec K, Budziszewska B, Reczyński W, **Doboszevska U**, Pilc A, Nowak G. Zinc deficiency alters responsiveness to antidepressant drugs in mice. *Pharmacol Rep.* 2013;65(3):579-92. doi: 10.1016/s1734-1140(13)71035-1. [MNiSW<sub>2013</sub>=25](#), [IF<sub>2013</sub>=2.165](#)

Młyniec K, **Doboszevska U**, Szewczyk B, Sowa-Kućma M, Misztak P, Piekoszevski W, Trela F, Ostachowicz B, Nowak G. The involvement of the GPR39-Zn(2+)-sensing receptor in the pathophysiology of depression. Studies in rodent models and suicide victims. *Neuropharmacology.* 2014;79:290-7. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.001. [MNiSW<sub>2014</sub>=40](#), [IF<sub>2014</sub>=3.049](#)

### Przeciwdepresyjne i przeciwłękowe działanie cynku i magnezu

Partyka A, Jastrzębska-Więsek M, Szewczyk B, Stachowicz K, Sławińska A, Poleszak E, **Doboszevska U**, Pilc A, Nowak G. Anxiolytic-like activity of zinc in rodent tests. *Pharmacol Rep.* 2011;63(4):1050-5. doi: 10.1016/s1734-1140(11)70621-1. [MNiSW<sub>2011</sub>=25](#), [IF<sub>2011</sub>=2.445](#)

Pochwat B, Szewczyk B, Sowa-Kucma M, Siwek A, **Doboszevska U**, Piekoszevski W, Gruca P, Papp M, Nowak G. Antidepressant-like activity of magnesium in the chronic mild stress model in rats: alterations in the NMDA receptor subunits. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014 Mar;17(3):393-405. doi: 10.1017/S1461145713001089. [MNiSW<sub>2014</sub>=40](#), [IF<sub>2014</sub>=4.009](#)

Młyniec K, Gaweł M, **Doboszevska U**, Starowicz G, Pytka K, Davies CL, Budziszewska B. Essential elements in depression and anxiety. Part II. *Pharmacol Rep.* 2015 Apr;67(2):187-94. doi: 10.1016/j.pharep.2014.09.009. [MNiSW<sub>2015</sub>=25](#), [IF<sub>2015</sub>=2.251](#)

Młyniec K, Gaweł M, **Doboszevska U**, Starowicz G, Nowak G. The Role of Elements in Anxiety. *Vitam Horm.* 2017;103:295-326. doi: 10.1016/bs.vh.2016.09.002. [MNiSW<sub>2017</sub>=20](#), [IF<sub>2017</sub>=3.286](#)

### 5.3. Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Po obronie doktoratu w Instytucie Farmakologii PAN zostałam laureatką konkursu Fuga 5 Narodowego Centrum Nauki (NCN). Dzięki temu odbyłam trzyletni staż podoktorski na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Realizowałam w charakterze kierownika projekt nr 2016/20/S/NZ7/00424. Moim opiekunem był Prof. Piotr Wlaź.

W celu wykonania doświadczeń stanowiących przedmiot projektu 2016/20/S/NZ7/00424 współpracowałam z:

- zespołem Katedry Fizjologii Zwierząt i Farmakologii pod kierownictwem Prof. Piotra Wlazia: dr hab. Katarzyną Socałą, dr hab. Dorotą Nieoczym i dr Mateuszem Pierogiem
- Uniwersytetem Jagiellońskim Collegium Medicum:
  - Zakładem Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej (dr Małgorzatą Szafarz, Prof. Elżbietą Wyską)
  - Katedrą Farmakobiologii (Prof. Katarzyną Młyniec, Prof. Gabrielem Nowakiem)
- Instytutem Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk
  - Zakładem Neurobiologii (dr Anną Rafało-Ulińską, dr hab. Bernadeta Szewczyk)
  - Pracownią Farmakologii i Biostruktury Mózgu (Prof. Marzeną Maćkowiak)
- Uniwersytetem Medycznym w Lublinie:
  - Katedrą Patofizjologii (dr Aleksandrą Wlaź)
  - Katedrą Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej (dr hab. Kingą Gawęł)
  - Pracownią Badań Przedklinicznych (dr hab. Anną Serefko, dr hab. Aleksandrą Szopą, Prof. Ewą Poleszak)
  - Katedrą Chemii Analitycznej (dr Jan Sawickim, Prof. Ireneuszem Sową)
- Zakładem Analizy Śladowej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, (dr Adamem Sajnogiem, Prof. Danutą Barańkiewicz)

- Chemical Neuroscience Group, Centre for Molecular Medicine Norway, University of Oslo, Gaustadalléen 21, Forskningsparken, 0349 Oslo, Norway (Prof. Camilla V. Esguerra, dr hab. Kinga Gawel)
- crisprmice.eu (dr Olga Gewartowska, dr Jakubem Gruchota, Prof. Andrzejem Dziembowskim)

Efektom projektu 2016/20/S/NZ7/00424 sa publikacje **P1-P4**, stanowiacie przedmiot osiagniecia opisanego w punkcie 4.

Ponizej podaje inne efekty realizacji projektu 2016/20/S/NZ7/00424 i projektu Mol-Med:

Na podstawie prac doswiadczalnych wykonanych w trakcie studiow doktoranckich (projekt Mol-Med) pod opieka Prof. Gabriela Nowaka i podczas realizacji projektu Fuga NCN pod opieka Prof. Piotra Wlazia zostalam laureatka prestiowych miedzynarodowych nagrod, przyznanych przez organizacje europejskie i amerykanskie. W 2019 r. otrzymalam nagrode *Heinz-Zumkley Prize* niemieckiego Towarzystwa ds. Mineralow i Pierwiastkow Sladowych (*German Society for Minerals and Trace Elements*), przyznawana mlodym naukowcom za wybitne osiagniecia i publikacje w tej dziedzinie badan. W 2020 r. otrzymalam *Trainee Professional Development Award*, nagrode przyznawana mlodym badaczom za doskonaosc w badaniach naukowych przez najwieksza na swiecie organizacje zrzeszajaca badaczy mozgu oraz klinicystow (neurologow i psychiatrow), *The Society for Neuroscience*, ktorej siedziba mieci sie w Waszyngtonie.

Moja praca naukowa zostala doceniona takze przez inne miedzynarodowe towarzystwa medyczne, czego dowodem jest przyznanie mi w 2021 r. pelnego czlonkostwa w europejskim towarzystwie neurologicznym (*European Academy of Neurology*), zrzeszajacym 47 towarzystw krajowych oraz 45 000 neurologow i badaczy. To wyroznienie otrzymalam na podstawie oceny calokszaltu dorobku oraz aktywnosci w tym stowarzyszeniu na przestrzeni kilku lat, poczawszy od czlonkostwa jako *Resident/Research Fellow*. Jako osoba posiadajaca pelne czlonkostwo mialam prawo uczestniczenia w nominowaniu naukowcow wyglaszajacych wykłady plenarne podczas kongresu *European Academy of Neurology 2022*.

Wyniki mojej pracy naukowej prezentowalam podczas niemal czterdziestu konferencji o zasiegu ogolnoswiatowym (m.in. *The Society for Neuroscience Annual*

*Meetings, European Academy of Neurology Congresses, European College of Neuropsychopharmacology Congresses*). Nadesłane przeze mnie doniesienia były wielokrotnie wybierane do sesji referatowych (m.in. podczas kongresów *European Academy of Neurology, European College of Neuropsychopharmacology, Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals, Italian Association for Study of Trace Elements in Living Organism*). Otrzymałam także liczne stypendia konferencyjne renomowanych organizacji europejskich (m.in. *European Academy of Neurology, European College of Neuropsychopharmacology, German Society for Minerals and Trace Elements*). Stypendia konferencyjne *European Academy of Neurology* otrzymywałam przez trzy kolejne lata (2022, 2021, 2020). Pełna lista wystąpień wraz z informacją jakie wyróżnienie (np. stypendium konferencyjne lub nagroda) było związane z danym abstraktem/wystąpieniem znajduje się w załączniku *Wykaz osiągnięć*.

Zakwalifikowałam się też do udziału i uczestniczyłam w wydarzeniach naukowych organizowanych przez uznane instytucje, opartych na selekcji. W 2022 wzięłam udział w *European Academy of Neurology Science School* pt. "*Pathophysiology of Disorders of the Nervous System*", której celem było wyznaczanie nowych standardów badań naukowych w neurologii, a w szczególności promowanie badań nad patofizjologią chorób neurologicznych i badań translacyjnych. W 2019 r. uczestniczyłam w *The Brain Prize Meeting* organizowanym przez duńską fundację *Lundbeck Foundation*. Celem spotkania było zapoznanie wybranych uczestników z laureatami nagrody *The Brain Prize*, największej na świecie nagrody przyznawanej zespołom składającym się z badaczy prowadzących badania podstawowe i klinicystów, których prace doprowadziły do przełomowego odkrycia w medycynie mającego znaczenie dla postępu w leczeniu chorób mózgu. Zakwalifikowałam się również do udziału w spotkaniu opartym na selekcji, organizowanym przez Fundację Polonium na Uniwersytecie Oxfordzkim w 2022 r., mającym na celu promowanie polskiej nauki, jednak z przyczyn losowych nie mogłam w nim uczestniczyć.

Oprócz realizacji badań związanych z projektem 2016/20/S/NZ7/00424, w trakcie stażu podoktorskiego na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie uczestniczyłam także w głównych kierunkach badań zespołu pod kierownictwem Prof. Piotra Wlazia, z zakresu epileptologii przedklinicznej i innych badaniach z zakresu neurofarmakologii. Współpracowałam z:

- Katedrą Farmacji Stosowanej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (zespołem pod kierownictwem Prof. Ewy Poleszak)
- II Katedrą i Kliniką Ginekologii w Lublinie (zespołem Prof. Andrzeja Wróbla)
- międzynarodowym zespołem składającym się z naukowców z Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum pod kierownictwem Prof. Pawła Zajdla oraz Instytutu Genomiki Funkcjonalnej Inserm/CNRS w Montpellier, pod kierownictwem Prof. Philippe Marina

Efektom pracy w tym ostatnim zespole jest wystąpienie na polsko-francuskich warsztatach pt. *New serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor biased ligands as perspective for the treatment of neurological disorders*, zorganizowanych w ramach programu Polonium, związane z prezentowaniem uzyskanych wyników doświadczalnych.

Poniżej podaję publikacje (inne niż **P1-P4**) będące efektem stażu na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie:

#### Wykorzystanie zwierzęcych modeli drgawek i padaczki:

Socła K, Nieoczym D, Pieróg M, Wyska E, Szafarz M, **Doboszevska U**, Właż P. Effect of Tadalafil on Seizure Threshold and Activity of Antiepileptic Drugs in Three Acute Seizure Tests in Mice. *Neurotox Res.* 2018 Oct;34(3):333-346. doi: 10.1007/s12640-018-9876-4. [MNiSW<sub>2018</sub>=25, IF<sub>2018</sub>=3.311](#)

Socła K, Mogilski S, Pieróg M, Nieoczym D, Abram M, Szulczyk B, Lubelska A, Latacz G, **Doboszevska U**, Właż P, Kamiński K. KA-11, a Novel Pyrrolidine-2,5-dione Derived Broad-Spectrum Anticonvulsant: Its Antiepileptogenic, Antinociceptive Properties and in Vitro Characterization. *ACS Chem Neurosci.* 2019;10(1):636-648. doi: 10.1021/acchemneuro.8b00476. [MNiSW<sub>2019</sub>=100, IF<sub>2019</sub>=4.486](#)

Socła K, **Doboszevska U**, Właż P. Salvinorin A Does Not Affect Seizure Threshold in Mice. *Molecules.* 2020 Mar 7;25(5):1204. doi: 10.3390/molecules25051204. [MNiSW<sub>2019</sub>=100, IF<sub>2020</sub>=4.411](#)

#### Wykorzystanie modelu *Danio rerio* do badania leków przeciwlękowych i przeciwdrgawkowych:

Pieróg M, Guz L, **Doboszevska U**, Poleszak E, Właż P. Effects of alprazolam treatment on anxiety-like behavior induced by color stimulation in adult zebrafish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018 Mar 2;82:297-306. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.08.025. [MNiSW<sub>2018</sub>=35, IF<sub>2018</sub>=4.315](#)



Pieróg M, Socala K, **Doboszevska U**, Wyska E, Guz L, Szopa A, Serefko A, Poleszak E, Wlaż P. Effects of new antiseizure drugs on seizure activity and anxiety-like behavior in adult zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021;15;427:115655. doi: 10.1016/j.taap.2021.115655. MEiN<sub>2021</sub>=140, IF<sub>2021</sub>=4.460

Pieróg M, Socala K, **Doboszevska U**, Wyska E, Guz L, Szopa A, Serefko A, Poleszak E, Wlaż P. Effects of classic antiseizure drugs on seizure activity and anxiety-like behavior in adult zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021;415:115429. doi: 10.1016/j.taap.2021.115429. MEiN<sub>2021</sub>=140, IF<sub>2021</sub>=4.460

#### Rola mikrobioty jelitowej w padaczce i depresji:

Socala K, **Doboszevska U**, Szopa A, Serefko A, Włodarczyk M, Zielińska A, Poleszak E, Fichna J, Wlaż P. The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Res.* 2021 172:105840. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105840. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105840. MEiN<sub>2021</sub>=100, IF<sub>2021</sub>=10.334

#### Receptory adenozynowe jako cel w leczeniu depresji:

Szopa A, Socala K, Serefko A, **Doboszevska U**, Wróbel A, Poleszak E, Wlaż P. Purinergic transmission in depressive disorders. *Pharmacol Ther.* 2021;224:107821. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107821. MEiN<sub>2021</sub>=200, IF<sub>2021</sub>=13.400

Szopa A, Poleszak E, Bogatko K, Wyska E, Wośko S, **Doboszevska U**, Świąder K, Wlaż A, Dudka J, Wróbel A, Wlaż P, Serefko A. DPCPX, a selective adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist, enhances the antidepressant-like effects of imipramine, escitalopram, and reboxetine in mice behavioral tests. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018 Dec;391(12):1361-1371. doi: 10.1007/s00210-018-1551-z. MNiSW<sub>2018</sub>=25, IF<sub>2018</sub>=2.058

Bogatko K, Poleszak E, Szopa A, Wyska E, Wlaż P, Świąder K, Wlaż A, **Doboszevska U**, Rojek K, Serefko A. The influence of selective A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptor antagonists on the antidepressant-like activity of moclobemide, venlafaxine and bupropion in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2018 Sep;70(9):1200-1208. doi: 10.1111/jphp.12954. MNiSW<sub>2018</sub>=25, IF<sub>2018</sub>=2.390

Szopa A, Bogatko K, Serefko A, Wyska E, Wośko S, Świąder K, **Doboszevska U**, Wlaż A, Wróbel A, Wlaż P, Dudka J, Poleszak E. Agomelatine and tianeptine antidepressant activity in mice behavioral despair tests is enhanced by DMPX, a selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist, but not DPCPX, a selective adenosine A<sub>1</sub> receptor antagonist. *Pharmacol Rep.* 2019 Aug;71(4):676-681. doi: 10.1016/j.pharep.2019.03.007. MNiSW<sub>2019</sub>=70, IF<sub>2019</sub>=2.754

Poleszak E, Szopa A, Bogatko K, Wyska E, Wośko S, Świąder K, **Doboszevska U**, Wlaż A, Wróbel A, Wlaż P, Serefko A. Antidepressant-Like Activity of Typical Antidepressant Drugs in the Forced Swim Test and Tail Suspension Test in Mice Is Augmented by DMPX, an Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Antagonist. *Neurotox Res.* 2019;35(2):344-352. doi: 10.1007/s12640-018-9959-2. MNiSW<sub>2019</sub>=70, IF<sub>2019</sub>=2.992

#### Układ endokannabinoidowy jako cel w leczeniu depresji:

Poleszak E, Wośko S, Sławińska K, Wyska E, Szopa A, **Doboszevska U**, Wlaż P, Wlaż A, Dudka J, Szponar J, Serefko A. Influence of the CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors on the activity of

the monoaminergic system in the behavioural tests in mice. *Brain Res Bull.* 2019 Aug;150:179-185. 10.1016/j.brainresbull.2019.05.021. [MNiSW<sub>2019</sub>=100](#), [IF<sub>2019</sub>=3.370](#)

Poleszak E, Wośko S, Sławińska K, Wyska E, Szopa A, Sobczyński J, Wróbel A, **Doboszewska U**, Właż P, Właż A, Szponar J, Skąlecki P, Serefko A. Ligands of the CB2 cannabinoid receptors augment activity of the conventional antidepressant drugs in the behavioural tests in mice. *Behav Brain Res.* 2020;378:112297. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112297. [MNiSW<sub>2019</sub>=100](#), [IF<sub>2020</sub>=3.332](#)

Poleszak E, Wośko S, Sławińska K, Wyska E, Szopa A, Świąder K, Wróbel A, Szponar J, **Doboszewska U**, Właż P, Właż A, Serefko A. Influence of the endocannabinoid system on the antidepressant activity of bupropion and moclobemide in the behavioural tests in mice. *Pharmacol Rep.* 2020;72(6):1562-1572. doi: 10.1007/s43440-020-00088-0. doi: 10.1007/s43440-020-00088-0. [MNiSW<sub>2019</sub>=70](#), [IF<sub>2020</sub>=3.024](#)

### Wpływ kofeiny na działanie leków przeciwdepresyjnych:

Szopa A, **Doboszewska U**, Herbet M, Wośko S, Wyska E, Świąder K, Serefko A, Korga A, Właż A, Wróbel A, Ostrowska M, Terlecka J, Kanadys A, Poleszak E, Dudka J, Właż P. Chronic treatment with caffeine and its withdrawal modify the antidepressant-like activity of selective serotonin reuptake inhibitors in the forced swim and tail suspension tests in mice. Effects on Comt, Slc6a15 and Adora1 gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017;337:95-103. doi: 10.1016/j.taap.2017.10.020. [MNiSW<sub>2017</sub>=40](#), [IF<sub>2018</sub>=3.585](#)

Szopa A\*, Poleszak E, **Doboszewska U\***, Herbet M, Świąder K, Wyska E, Serefko A, Właż A, Korga A, Ostrowska M, Juś P, Jedynek S, Dudka J, Właż P. Withdrawal of caffeine after its chronic administration modifies the antidepressant-like activity of atypical antidepressants in mice. Changes in cortical expression of Comt, Slc6a15 and Adora1 genes. *Psychopharmacology (Berl).* 2018 Aug;235(8):2423-2434. doi: 10.1007/s00213-018-4940-6. [MNiSW<sub>2018</sub>=35](#), [IF<sub>2018</sub>=3.424](#)

### Poszukiwanie nowych możliwości leczenia pęcherza nadreaktywnego, o potencjalnie korzystnym działaniu przy współistniejącej depresji:

Wróbel A\*, **Doboszewska U\***, Rechberger E, Właż P, Rechberger T. SN003, a CRF<sub>1</sub> receptor antagonist, attenuates depressive-like behavior and detrusor overactivity symptoms induced by 13-cis-retinoic acid in rats. *Eur J Pharmacol.* 2017 Oct 5;812:216-224. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.07.010. [MNiSW<sub>2017</sub>=30](#), [IF<sub>2017</sub>=3.040](#)

Wróbel A, **Doboszewska U**, Rechberger E, Rojek K, Serefko A, Poleszak E, Skalicka-Woźniak K, Dudka J, Właż P. Rho kinase inhibition ameliorates cyclophosphamide-induced cystitis in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2017 Jun;390(6):613-619. doi: 10.1007/s00210-017-1361-8. [MNiSW<sub>2017</sub>=25](#), [IF<sub>2017</sub>=2.238](#)

Wróbel A\*, **Doboszewska U\***, Rechberger E, Bańczerowska-Górska M, Czuczwar P, Poleszak E, Dudka J, Właż P, Miotła P, Włażlak E, Rechberger T. Blebbistatin, a Myosin II Inhibitor, Exerts Antidepressant-Like Activity and Suppresses Detrusor Overactivity in an Animal Model of Depression Coexisting with Overactive Bladder. *Neurotox Res.* 2019;35(1):196-207. doi: 10.1007/s12640-018-9948-5. [MNiSW<sub>2019</sub>=70](#), [IF<sub>2019</sub>=2.992](#)

Wróbel A\*, Nowakowski Ł, **Doboszewska U\***, Rechberger E, Bańczerowska-Górska M, Włażlak E, Zakrocka I, Właż P, Semczuk A, Dudka J, Poleszak E. Blebbistatin reveals

beneficial effects on the cystometric parameters in an animal model of detrusor overactivity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2019 Jul;392(7):843-850. doi: 10.1007/s00210-019-01640-3. [MNiSW<sub>2019</sub>=70](#), [IF<sub>2019</sub>=2.050](#)

#### 5.4. Uniwersytet Jagielloński Collegium-Medicum

Po zakończeniu stażu na Uniwersytecie Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie, pracowałam na stanowisku *post-doc* w kolejnej jednostce naukowej - na Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium-Medicum, w projekcie finansowanym przez NCN, pod kierownictwem Prof. Katarzyny Młyniec (2018/31/B/NZ7/00247, projekt w toku).

##### Publikacja będące efektem projektu 2018/31/B/NZ7/00247:

Młyniec K, Siodlak D, **Doboszevska U**, Nowak G. GPCR oligomerization as a target for antidepressants: Focus on GPR39. *Pharmacol Ther.* 2021;225:107842. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107842. [MEiN<sub>2021</sub>=200](#), [IF<sub>2021</sub>=13.400](#)

##### Inna publikacja związana z pracą na Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium-Medicum:

**Doboszevska U**, Wlaz P, Nowak G, Młyniec K. Targeting zinc metalloenzymes in COVID-19. *British Journal of Pharmacology*, 2020, 177(21):4887-4898. doi: 10.1111/bph.15199. [MNiSW<sub>2019</sub>=140](#), [IF<sub>2020</sub>=8.739](#)

#### 5.5. King's College London

Jako pracownik Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium-Medicum odbyłam dwie krótkoterminowe wizyty w ramach programu Erasmus + w jednym z najstarszych uniwersytetów w Anglii, który rokrocznie plasuje się w czołówce najlepszych uniwersytetów na świecie – *King's College London*. Celem wizyt było zaznajomienie z metodami badawczymi wykorzystywanymi w *London Metallomics Facility*, a także nawiązanie kontaktów z naukowcami z tej uczelni. Moim opiekunem w King's był Prof. Wolfgang Maret. Kontynuuję pracę pod jego opieką merytoryczną.

##### Efektem wizyt są następująca publikacja i list do czasopisma *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*:

**Doboszevska U**, Maret W, Wlaz P. GPR39 – an orphan receptor begging for ligands. *Drug Discovery Today* (artykuł na zaproszenie, w recenzji)

**Doboszevska U**, Maret W, Wlaź P. GPR39 deorphanization: The long and winding road to eicosanoids and a crosstalk between GPR39 and hedgehog signaling in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023 Jul 11;120(28):e2308227120. doi: 10.1073/pnas.2308227120. MEiN<sub>2023</sub>=200, IF<sub>2022</sub>=11.1

W związku z opublikowanym w *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* listem zostałam ostatnio zaproszona do uczestniczenia w nominowaniu do nagrody *Cozzarelli Prize*. W trakcie wizyt w King's College nawiązałam także kontakty z Prof. Christerem Hogstrandem i dr Bahijja Raimi-Abraham, z którą planujemy wspólną aplikację w europejskim programie *COST Action*.

Podsumowując, pracowałam w kilku jednostkach naukowych (Instytut Farmakologii PAN, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Uniwersytet Jagielloński Collegium-Medicum w Krakowie), a efektem pracy w każdej z nich są opublikowane artykuły. Zrealizowałam też światowy standard, będący w wielu miejscach także obowiązkiem, aby młodzi doktorzy kolejne projekty wykonywali w zespołach badawczych poza jednostką, w której uzyskali stopień doktora. Ponadto obylałam wizyty w jednostkach zagranicznych (University of Strathclyde, King's College London). Nawiązane kontakty z naukowcami z tych jednostek, opublikowane artykuły oraz uzyskane nagrody i wyróżnienia, które zostały przyznane przez międzynarodowe towarzystwa naukowe, wskazują na moją znaczną aktywność naukową.

## 6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

### 6.1. Działalność dydaktyczna:

- 1) Prowadzenie zajęć dydaktycznych na temat „*Animal models for anti-cancer drug development*” dla studentów anglojęzycznych kierunku *Drug Discovery and Development* na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM (seminarium) (2023)
- 2) Współautorstwo rozdziału w skrypcie dla studentów Wydziału Farmaceutycznego UJ CM na temat wtórnych przekaźników informacji (2022)
- 3) Udział w prowadzeniu zajęć dydaktycznych na temat „Neurobiologia i terapia zaburzeń psychicznych” dla studentów V roku kierunku farmacja na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM (seminaria) (2012, 2011)
- 4) Udział w opiece nad studentami zagranicznymi programu Socrates-Erasmus na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM (2011)
- 5) Udział w opiece nad studentami Wydziału Farmaceutycznego UJ CM odbywającymi półroczną praktykę zawodową (2010)

### 6.2. Działalność popularyzująca naukę:

- 1) Wykład podczas konferencji organizowanej przez krakowski oddział Młodej Farmacji (sekcję studencką Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego) na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM w Krakowie, współfinansowanej przez firmę Servier, na temat zdrowia mózgu: Cynk w chorobach mózgu – od suplementacji do elementów sygnalizacji cynkiem jako celu dla przyszłych leków (24.05.2023)
- 2) Wykład podczas Forum Młodych Naukowców, organizowanym na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie, na temat pozyskiwania środków na realizację badań naukowych: Młodzi pytają – młodzi i doświadczeni odpowiadają. Panel II: Fajny pomysł – skąd wziąć pieniądze? FUGA – Narodowe Centrum Nauki (21.03.2019)

## 7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.

### 7.1. Nagrody międzynarodowe:

- 1) ***Trainee Professional Development Award 2020***, nagroda dla młodych badaczy za doskonałość w badaniach naukowych, przyznana przez największą na świecie organizację zrzeszającą naukowców zajmujących się tematyką mózgu: ***The Society for Neuroscience***
- 2) ***Heinz-Zumkley-Prize 2019***, nagroda dla młodych badaczy za wyjątkowe osiągnięcia i publikacje w dziedzinie badań minerałów i pierwiastków śladowych, przyznana przez niemieckie towarzystwo naukowe: ***the German Society for Minerals and Trace Elements***

### 7.2. Nagrody krajowe:

- 1) **Nagroda indywidualna Rektora** Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie za wysoko punktowany artykuł naukowy **2018**
- 2) **Nagrody *Qualitas/Quantitas***, przyznawane w Instytucie Farmakologii Polskiej Akademii Nauk, za publikacje naukowe, **2016 i 2015**
- 3) **Wyróżnienie pracy doktorskiej** przez Radę Programową projektu Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie Nauki Molekularne dla Medycyny **2015**, nagroda finansowana przez Europejski Fundusz Społeczny Program Operacyjny Kapitał Ludzki
- 4) **Stypendium *Doctus*** – Małopolski Fundusz Stypendialny dla Doktorantów 2012-2015, finansowane przez Europejski Fundusz Społeczny Program Operacyjny Kapitał Ludzki **2012-2015**

### 7.3. Stypendia konferencyjne przyznane przez międzynarodowe towarzystwa naukowe:

- 1) Stypendium konferencyjne *European Academy of Neurology 2022*, przyznane w celu udziału w *1<sup>st</sup> European Academy of Neurology Science School "Pathophysiology of Disorders of the Nervous System" 2022*

- 2) Stypendium konferencyjne *European Academy of Neurology 2022*, przyznane w celu udziału w kongresie *European Academy of Neurology 2022*
- 3) Stypendium konferencyjne *European Academy of Neurology 2021*, przyznane w celu udziału w kongresie *European Academy of Neurology 2021*
- 4) Stypendium konferencyjne *European Academy of Neurology 2020*, przyznane w celu udziału w kongresie *European Academy of Neurology 2020*
- 5) Dofinansowanie udziału w kongresie *European College of Neuropsychopharmacology 2020*
- 6) Stypendium konferencyjne *German Society for Minerals and Trace Elements 2019*, przyznane w celu udziału w *International Symposium of the Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals, Annual Society for Minerals and Trace Elements Meeting 2019* i odebrania nagrody *Heinz-Zumkley-Prize 2019*
- 7) Stypendium konferencyjne *Lundbeck Foundation*, przyznane w celu udziału w *The Brain Prize Meeting 2019*
- 8) Dofinansowanie udziału w kongresie *Central European Biomedical Congress 2018*
- 9) Dofinansowanie udziału w kongresie *BIT's 1st Annual World Congress of Dementia 2015*
- 10) Dofinansowanie udziału w kongresie *European College of Neuropsychopharmacology 2013*
- 11) Stypendium konferencyjne *European College of Neuropsychopharmacology*, przyznane w celu udziału w *European College of Neuropsychopharmacology Workshop for Young Scientists 2013*

#### **7.4. Stypendia przyznane w celu pobytu w zagranicznych ośrodkach badawczych:**

- 1) 2023 Erasmus + *staff mobility for training*, stypendium z Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medium na krótkoterminowy pobyt na *Universita degli Studi G. d'Annunzio Chieti e Pescara*, pod opieką Prof. Stefano Sensi

- 2) 2022 Erasmus + *staff mobility for training*, stypendium z Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum na krótkoterminowy pobyt w *King's College London*, pod opieką Prof. Wolfganga Mareta
- 3) 2021 Erasmus + *staff mobility for training* stypendium z Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum na krótkoterminowy pobyt w *King's College London*, pod opieką Prof. Wolfganga Mareta
- 4) 01.03.2009 – 30.06.2009 stypendium Erasmus z Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum na czteromiesięczny pobyt badawczy na *University of Strathclyde, Strathclyde Institute for Drug Research* pod opieką Prof. Alan Harvey

#### **7.5. Inne przyznana stypendia:**

- 1) 01.03.2011 – 28.02.2015 stypendium doktoranckie, Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie "Nauki Molekularne dla Medycyny", Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni Polskiej Akademii Nauk im. Jerzego Habera (współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego – Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007 – 2013)
- 2) 01.10.2010 – 31.09.2015 stypendium doktoranckie, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
- 3) 01.10.2014 – 30.09.2015 zwiększenie stypendium doktoranckiego z dotacji projakościowej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
- 4) 01.10.2004 – 31.03.2010 stypendium naukowe, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
- 5) 01.10.2009 – 31.03.2010 stypendium sportowe, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

.....  
(podpis wnioskodawcy)