



**Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk**

**Zakład Neurotoksykologii**

**Prof. dr hab. Magdalena Zielińska – Kierownik**

Tel: (48 22) 608 64 70

Fax: (48 22) 608 64 42

e-mail: mzielinska@imdik.pan.pl

Warszawa, 10.08.2020r.

**Rada Naukowa**

Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

mgr Pauliny Cieślik

pt. „Jednoczesna aktywacja receptorów muskarynowych oraz receptorów regulujących uwalnianie glutaminianu jako nowy mechanizm działania leków przeciwpsychotycznych.”

**OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Pauliny Cieślik została wykonana w Zakładzie Neurobiologii Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Funkcję promotora rozprawy powierzono dr hab. Joannie Wierońskiej. Podstawę rozprawy stanowią cztery prace oryginalne: Cieślik i wsp. (2018) *Psychopharmacology*; Cieślik i wsp. (2019) *Behav Brain Res*; Cieślik i wsp., (2019) *Int J Mol Sci*; Cieślik i wsp. (2020) *Neuropharmacology* o łącznym współczynniku wpływu wynoszącym 14, 744; dające wg punktacji ministerialnej 100 pkt (jedna publikacja) i 140 pkt (trzy publikacje). We wszystkich wymienionych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, zaś Pani Promotor pełni rolę autora do korespondencji. Oświadczenia autorów prac wskazują na rolę Doktorantki w wykonaniu i analizie wyników testów behawioralnych, wykonaniu oznaczeń prolaktyny, udziale w wykonaniu badań immunohistochemicznych oraz udziale w pisaniu manuskryptów.

Badania stanowiące podstawę pracy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu nr 2015/17/B/NZ7/02984 pozyskanego przez Promotora rozprawy w ramach konkursu OPUS 9.

Kompozycja przedłożonej pracy obok klasycznych elementów: Spisu treści, Streszczenia w wersji polskiej i angielskiej, Wykazu skrótów czy Listy związków, zawiera Założenia projektu w postaci opisu wprowadzającego i uzasadniającego podjęcie badań, Cel pracy, Dyskusję, Podsumowanie i Bibliografię – elementy te zostały postawione na 46 stronach obejmujących także 3 ryciny i 3 tabele. Do rozprawy dołączono wymagane Oświadczenia współautorów prac i kopie publikacji - najistotniejszy element dysertacji dokumentujący wykonanie badań.

## MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY

W kontekście prowadzonych badań nad patomechanizmem i terapią zaburzeń psychicznych stających się, a raczej już będących globalną epidemią, badane zagadnienia są nadal aktualne i pozostają w obrębie zainteresowań naukowych ośrodków krajowych i światowych. Temat dotyczy bowiem schizofrenii, przewlekłej choroby psychicznej o zróżnicowanym przebiegu i obrazie klinicznym prowadzącej do degradacji osobowości i destrukcyjnego upośledzenia funkcjonowania społecznego. Temat pracy w naturalny sposób wynika z tematyki badawczej i zainteresowań pracowników Zakładu Neurobiologii IF, poszukujących w patomechanizmie schizofrenii szczegółowych elementów mogących w sposób bardziej selektywny stać się punktem uchwytu terapii schorzenia, pozostającego wyzwaniem dla współczesnego świata nauki. Biorąc od uwagę literaturę przedmiotu, jak i mając świadomość konieczności skutecznego poszukiwania efektywnej i bezpiecznej terapii schizofrenii, wybór celu rozprawy uważam za uzasadniony, a podjęte przez Doktorantkę zagadnienie za oryginalne i aktualne oraz stanowiące istotny element poznawczy w tym obszarze nauki.

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy badania efektów działania ligandów receptorów muskarynowych  $M_1$ ,  $M_4$ ,  $M_5$ , i ich działania po łącznym podaniu z ligandami receptorów metabotropowych dla glutaminianu  $mGlu_2$  i  $mGlu_4$  oraz receptora  $GABA_B$ , w zwierzęcych farmakologicznych modelach odtwarzających niektóre zaburzenia behawioralne, nazywane przez Doktorantkę „modelami schizofrenii”.

W Założeniach rozprawy znalazły się ogólne informacje dotyczące etiologii, epidemiologii i charakterystyki schizofrenii, klasyfikacja objawów choroby z uwzględnieniem i pobieżnym omówieniem niedoskonałości dostępnej farmakoterapii. W dalszej części przedstawiono glutaminianergiczną hipotezę patomechanizmu schizofrenii; tu Doktorantka zamieściła pomocną rycinę przedstawiającą podłoże omawianej hipotezy. Kolejnym elementem Założeń pracy było omówienie badań dotyczących efektów działania xanomeliny, agonisty receptorów muskarynowych i dokładniejsze scharakteryzowanie poszczególnych klas tych receptorów, których bezpośrednio dotyczyły badania. W Tabeli 1, która w zamierzeniu miała dotyczyć lokalizacji receptorów muskarynowych  $M_1$ - $M_5$  w tkankach obwodowych i w mózgu, brakuje jednak informacji dotyczących lokalizacji badanego receptora  $M_5$ . Co więcej, jako element pomocniczy odnoszący się do treści pracy, tabela powinna wg mojej oceny dotyczyć dystrybucji receptorów u człowieka, jednak dotyczy szczura, czego nie doprecyzowano w jej opisie. Wydaje mi się również, że zamieszczenie bardziej aktualnych danych źródłowych np. z Protein Brain Atlas (<https://www.proteinatlas.org>) byłoby mimo

wszystko bardziej właściwe, a na pewno bardziej aktualne.

W ostatnim podrozdziale Doktorantka powraca do wcześniej omawianej teorii glutaminianergicznej patogenezы schizofrenii - tu należy podkreślić - jednej z wielu koncepcji, jako że schorzenie ma wieloczynnikowy charakter, tym razem poprzez omówienie - jak ma wskazywać tytuł podrozdziału - receptorów regulujących uwalnianie glutaminianu, podczas gdy treść tej części pracy dotyczy efektów działania wybranych ligandów receptorów glutaminianergicznych mGlu<sub>2</sub>, mGlu<sub>3</sub>, mGlu<sub>4</sub> i GABA<sub>B</sub>. Brak precyzji w tej części pracy jest więc oczywisty.

Do tej części pracy mam kilka uwag:

Doktorantka opisuje w Założeniach na str. 23, że stosowanie selektywnych i nieselektywnych ligandów receptora mGlu<sub>2</sub> w badaniach klinicznych było nieskuteczne, jednocześnie obserwowano pozytywne efekty w badaniach przedklinicznych. Ciekawi mnie zatem jakie były dodatkowe przesłanki do stosowania liganda mGlu<sub>2</sub>? Co, zdaniem Doktorantki, miało determinować jego skuteczność w przedstawionych badaniach i zwiększyć możliwość uzyskania klinicznie potwierdzonego efektu w przyszłości – co jest jak zakładam - celem nadrzędnym badań.

Dla równowagi i większego uszczegółowienia merytorycznego, jak również w kontekście opisywanego braku terapeutycznego efektu ligandów receptora mGlu<sub>2</sub> w badaniach klinicznych, zabrakło informacji o klinicznych efektach działania ligandów dla pozostałych badanych w pracy receptorów mGlu<sub>4</sub> i GABA<sub>B</sub>. Czy są dostępne takie dane w kontekście badanego schorzenia?

Doktorantka twierdzi, że „...stosowanie niskich, nieefektywnych dawek ligandów działających na różne typy receptorów może być bardziej efektywne w przypadku pacjentów, u których występuje zmniejszona ekspresja jednego z receptorów lub jego dysfunkcja”, chciałbym się dowiedzieć czy dostępne są dane źródłowe opisujące pacjentów, u których obserwowano obniżony poziom ekspresji receptorów muskarynowych lub receptorów metabotropowych dla glutaminianu badanych klas. Ponadto prosiłabym o wyjaśnienie prawidłowości tego założenia (umieszczonego dwukrotnie: str. 24 i str. 34) w kontekście wyników Doktorantki, które wskazują, że podania łączne niskich, nieefektywnych dawek ligandów wykazują podobne działanie jak podanie jedynie ligandów receptorów muskarynowych.

Cel pracy został sformułowany w punktach na kolejnej stronie. Metodyka ze względu na wybraną formę zbioru artykułów nie była opisywana. Zastosowane farmakologiczne „modele schizofrenii” opierały się na ostrym lub przewlekłym podaniu niekompetycyjnego antagonisty receptora NMDA, MK-801; dopamino-mimetyku –

amfetaminy lub 2,5-dimetoksy-4-jodoamfetaminy (DOI). W stosowanym układzie doświadczalnym na podstawie szeregu testów behawioralnych charakteryzowano potencjał zastosowanych ligandów wybranych receptorów muskarynowych w eliminowaniu wyselekcjonowanych odruchów zwierząt ekstrapolowanych na objawy wytwórcze, deficytowe i poznawcze towarzyszące pacjentom ze zdiagnozowaną schizofrenią. Badano działanie ligandów receptorów M<sub>1</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub>, oraz efekty po ich jednoczesnym podaniu z ligandami receptorów glutaminianergicznych mGlu<sub>2</sub>, mGlu<sub>4</sub> i receptora GABA<sub>B</sub>. Sprawdzone czy stosowane ligandy przechodzą przez barierę krew-mózg, ich farmakokinetykę oraz działania niepożądane (zaburzenia koordynacji ruchowej i wzmożone wydzielanie prolaktyny).

Nie zamieszczono rezultatów badań, co trochę zaskakuje, gdyż wyniki uważam za najbardziej istotną część każdej pracy naukowej. W ocenie recenzenta ich zwięzłe przedstawienie w punktach czy tabeli byłoby wartościowe i pomocne dla czytającego. Tu należy przyznać, że Doktorantka pokusiła się o zestawienie tabelaryczne części wyników, jednak do efektu odniosę się w dalszej części recenzji.

W opinii Recenzenta oryginalnymi osiągnięciami naukowymi Doktorantki są:

-wykazanie w pracy 1, że związki jednocześnie aktywujące receptory M<sub>4</sub> i mGlu<sub>4</sub> mogą być skuteczne w łagodzeniu zaburzeń określanych jako wytwórcze, deficytowe i poznawcze w modelach zwierzęcych opartych na farmakologicznym podaniu MK-801 i amfetaminy;

-wykazanie w pracy 2, że łączne podania nieefektywnych dawek allosterycznego modulatora receptora GABA<sub>B</sub> i M<sub>4</sub> łagodzi syndrom behawioralny indukowany agonistą receptorów 5-HT<sub>2A</sub> (potrząśnięcia głową) oraz osłabiały miniaturowe potencjały czynnościowe, co może świadczyć, że z poziomu presynaptycznego dochodzi do zahamowania uwalniania glutaminianu; łączne podania nieefektywnych dawek liganda M<sub>4</sub> lub M<sub>5</sub> czy agonisty receptora M<sub>1</sub> odwracały deficyty poznawcze w teście rozpoznawania nowego obiektu po podaniu MK-801, co wskazuje na przeciwpsychotyczny potencjał badanych związków, nie wpływając na koordynację ruchową zwierząt przy jednoczesnym braku interakcji receptorowych w przypadku stosowania ligandów M<sub>1</sub> i M<sub>4</sub>;

-wykazanie w pracy 3, że związki jednocześnie aktywujące receptory M<sub>4</sub> i mGlu<sub>2</sub> mogą skutecznie odwracać zaburzenia określane jako deficytowe i poznawcze w modelach zwierzęcych opartych na farmakologicznym podaniu MK-801, przy jednoczesnym braku interakcji między stosowanymi ligandami;

-wykazanie w pracy 4, że łączne podania nieefektywnych dawek allosterycznego agonisty

receptora  $M_1$ , pozytywnego allosterycznego modulatora receptora  $M_5$  oraz liganda  $mGlu_2$ , wykazują skuteczność w łagodzeniu efektów deficytów poznawczych w teście rozpoznawania nowego obiektu, teście odroczonej alteracji przestrzennej, teście bramkowania sensorycznego po podaniu MK-801, nie wpływając na koordynację ruchową zwierząt i stężenie prolaktyny; jednocześnie wykazanie dla ligandów receptorów  $M_1$  i  $M_5$  braku interakcji;

W Dyskusji Doktorantka omawia i analizuje główne wyniki badań zamieszczone w pracach. Rozdział ten jest w zasadzie poprawnie napisany, jednak pozostaje wrażenie dosyć pobieżnego skonfrontowania z danymi z piśmiennictwa i ich zbyt uogólniona interpretacja. Doktorantka przedstawiła tabelę sumarycznie analizującą profil działania zastosowanych ligandów receptorów muskarynowych (Tabela 2) oraz tabelę analizującą profil działania łącznego podania stosowanych ligandów receptorów muskarynowych, ligandów receptorów glutaminianergicznym ( $mGlu_2$ ,  $mGlu_4$ ) i receptora  $GABA_B$  (Tabela 3). Zamierzenie słuszne i wydawałoby się pomocne, jednak rezultat nie został osiągnięty – głównie przez brak ujednolicenia obu Tabel; W Tabeli 2 przedstawiono charakterystykę działania ligandów receptorów muskarynowych wymieniając stosowane w badaniach testy behawioralne, podczas gdy w Tabeli 3 przedstawiono efekt aktywności receptorów muskarynowych, receptorów metabotropowych dla glutaminianu i receptora  $GABA_B$  na objawy schizofrenii klasyfikowane jako zaburzenia wytwórcze, deficytowe i poznawcze. W Tabeli 2 zostały wymienione robocze nazwy ligandów dla receptorów, zaś w Tabeli 3 posłużono się akronimami receptorów. Dodatkowo podpis Tabeli 3 jest nieprawidłowy, gdyż nie zamieszczono w niej jak wspomniałam aktywności pojedynczych podań ligandów receptorów. Powyższe uchybienia utrudniały czytanie tego fragmentu pracy, w którym Doktorantka dodatkowo naprzemiennie posługuje się akronimami receptorów i nazwami związków. Wytlumaczeniem takiej dowolności może być bardzo dobra znajomość poruszanej w pracy problematyki oraz piśmiennictwa w zakresie prowadzonych badań, jednak jakakolwiek konsekwencja byłaby wskazana. W pozostałej części rozdziału Doktorantka zaproponowała mechanizmy regulacji nadmiernego uwalniania glutaminianu przez ligandy badanych receptorów z uwzględnieniem pre- i postsynaptycznej lokalizacji receptorów muskarynowych ( $M_4$  vs  $M_1$  i  $M_5$ ) oraz mechanizmu ich działania poprzez aktywację białek wiążących GTP. W zaproponowanej Rycinie 3 zabrakło wyjaśnienia jaką rolę mogą tu odgrywać presynaptycznie zlokalizowane receptory  $mGlu_2$ ,  $mGlu_4$  czy  $GABA_B$ .

Mam pytanie o znaczenie dla interpretacji wyników odmiennego dla szczura i myszy profilu ko-lokalizacji receptorów  $mGlu_2$ - $M_1$  i  $mGlu_2$ - $M_5$  (wyniki zamieszczone w pracy

Cieślik i wsp., 2020). W kontekście łącznych podań ligandów tych typów receptorów uważam za warte omówienia.

Analogicznie: czy nieco odmiennie właściwości farmakokinetyczne badanych ligandów receptorów w przypadku szczura i myszy mogą mieć znaczenie dla interpretacji wyników testów behawioralnych?

Autorka postuluje, że stosowane łączne podania związków niosą istotny potencjał terapeutyczny. Czy można opierając się na wynikach zamieszczonych w czterech bardzo dobrze opublikowanych pracach zdefiniować lub określić w którym ze stosowanych połączeń związków Doktorantka upatruje większą skuteczność w zastosowaniu klinicznym? Ewentualnie, które z połączeń miałyby największe szanse na potwierdzenie obserwowanego efektu?

W części dotyczącej Podsumowania badań, wydaje się, że prostszą byłaby sprawdzona formuła edytorska bezpośrednio odnosząca się do postawionych w formie trzech punktów Celów badań, nie mniej jednak Doktorantka użyła formy opisowej, w której twierdzi, że zarówno stosowanie efektywnych stężeń ligandów receptorów muskarynowych, jak i jednoczesne stosowanie niskich, nieefektywnych stężeń ligandów receptorów muskarynowych i ligandów receptorów metabotropowych dla glutaminianu mGlu<sub>2</sub>, mGlu<sub>4</sub> oraz liganda receptora GABA<sub>B</sub>, łagodzi efekty behawioralne po podaniu MK-801 lub amfetaminy czy po podaniu DOI, oraz że stosowane farmakologiczne interwencje nie wywołują działań niepożądanych. Pewien brak precyzji odnajduję w ostatnim akapicie Podsumowania, gdyż Doktorantka nie dostarczyła podstaw, aby twierdzić, że „działanie (receptorów M<sub>1</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub>) może być nasilane przez ligandy receptorów regulujących uwalnianie glutaminianu (mGlu<sub>2</sub>, mGlu<sub>4</sub> lub GABA<sub>B</sub>)”. Na podstawie których wyników został wysunięty taki wniosek? Proszę o odniesienie się do tego sformułowania.

#### PODSUMOWANIE I WNIOSEK KOŃCOWY

O wartości pracy doktorskiej Pani mgr Pauliny Cieślik świadczą jej walory poznawcze. Doceniam próbę łącznego przedstawienia tak dużej liczby wyników, jednak znalezienie wspólnego mechanizmu przy uwzględnieniu odmiennego mechanizmu działania klas receptorów muskarynowych, ich kolokalizacji wraz ze współ-aktywacją receptorów metabotropowych dla glutaminianu i receptora GABA<sub>B</sub> z raczej zrozumiałych względów pozbawiło pracę wartościowych szczegółów. Należy podkreślić, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały opublikowane w periodykach o międzynarodowym zasięgu, i wskazują na nową możliwość terapeutycznego zastosowania łącznych podań ligandów receptorów muskarynowych M<sub>1</sub>, M<sub>4</sub> i M<sub>5</sub>, receptorów glutaminianergicznych mGlu<sub>2</sub>, mGlu<sub>4</sub> i liganda receptora GABA<sub>B</sub>, eliminując ryzyko wystąpienia działań niepożądanych

(tu: podwyższona aktywność lokomotoryczna i hiperprolaktynemia) przy zachowaniu ich efektywnego działania.

W podsumowaniu stwierdzam, że mgr Paulina Cieślik posługuje się różnymi technikami badawczymi do rozwiązywania problemów naukowych i wykazała się samodzielnością w prowadzeniu i analizowaniu badań. Rozprawa doktorska ma charakter oryginalnej pracy doświadczalnej, co zostało już potwierdzone załączonymi publikacjami. Przeprowadzone badania są nowatorskie i kompleksowe oraz spełniają kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w zakresie Sztuki (Dz. Ustaw z 2017r., poz. 1789 ze zm.). Pozwala mi to zwrócić się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk z wnioskiem o dopuszczenie mgr Pauliny Cieślik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**KIEROWNIK  
Zakładu Neurotoksykologii**



*Prof. dr hab. n. med. Magdalena Zielińska*  
Prof. Magdalena Zielińska