

Prof. dr hab. n. med. Ewa Obuchowicz
Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii
Wydział Nauk Medycznych w Katowicach
Śląski Uniwersytet Medyczny

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Łucji Kudły

„Badanie działania nowych funkcjonalnie selektywnych agonistów receptorów opioidowych”

Ból będący doznaniem fizycznym i emocjonalnym jest jednym z najczęstszych objawów choroby lub istotą zespołu chorobowego. Zwłaszcza ból o dużym nasileniu wymaga optymalnej, skutecznej terapii. Bez wątpienia lekami o najwyższej skuteczności są opioidy, a przede wszystkim agoniści receptorów μ opioidowych. Leki te jednak oprócz korzystnych efektów terapeutycznych wywołują szereg działań niepożądanych. Ponadto, w wyniku ich stosowania przez dłuższy czas rozwija się zjawisko tolerancji, czego efektem jest osłabienie działania przeciwbólowego. Stosowanie opioidów niesie ze sobą ryzyko uzależnienia, którego nasilenie zależy zarówno od leku, jak i jego drogi podania. Dlatego poszukiwanie nowych leków z grupy opioidów o lepszym profilu działania farmakologicznego jest odpowiedzią na istotne potrzeby kliniczne. Uważam więc, że projekt badawczy zrealizowany przez Panią mgr jest bardzo ważny, a uzyskane wyniki dają nadzieję na poprawę w przyszłości terapii bólu i zaburzeń związanych z uzależnieniem od opioidów.

Bardzo interesująca jest koncepcja pracy. Doktorantka przeprowadziła szeroko zaplanowane badania behawioralne wzbogacone badaniami biochemicznymi trzech agonistów receptorów μ opioidowych pod kątem ich działania antynocyceptywnego, potencjału uzależniającego i działania w warunkach stresu. Pierwsze doniesienia na temat efektów antynocyceptywnych badanych związków zostały opublikowane w 2016 i 2017 r. Związki te charakteryzują się wysokim współczynnikiem selektywności wobec ścieżki zależnej od białka G. Idea pracy nawiązuje do hipotezy zgodnie z którą proces transdukcji sygnału po aktywacji receptora μ zależy od złożonej sieci ścieżek wewnątrzkomórkowych, wśród których istotne są ścieżka białka G i ścieżka β -arestyny-2. Wyniki badań wskazywały, że ligandy, które są preferencyjnymi lub selektywnymi agonistami szlaku białka G, a nie β -

arestyny-2 wywołują korzystne efekty farmakologiczne w porównaniu do konwencjonalnych agonistów receptora μ opioidowego. Jednakże dane ostatnich lat sugerują, że prawdopodobnie selektywność funkcjonalna ligandów może mieć znaczenie tylko dla pewnych efektów farmakologicznych. Tak więc, znaczenie idei selektywności funkcjonalnej dla opracowania skutecznych, bezpiecznych i słabiej uzależniających leków pozostaje problemem otwartym i kontrowersyjnym. Z uznaniem należy podkreślić, że praca Doktorantki, która wpisuje się w ten nowy trend badań farmakologicznych nad opioidami, przyniosła szereg wyników, które powinny być brane pod uwagę przy opracowaniu nowych leków.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami – liczy wraz z piśmiennictwem 155 stron, podzielona jest na typowe rozdziały; zawiera streszczenie w j. polskim i angielskim, spis tabel i rycin, wykaz wybranych skrotów z ich dwujęzycznym wyjaśnieniem. Badania były finansowane z grantów Narodowego Centrum Nauki - grantu PRELUDIUM 17, którego Pani mgr była kierownikiem i grantu OPUS 16. W ramach konkursu NCN ETIUDA 8 Pani mgr uzyskała stypendium doktorskie. Fakty te niewątpliwie świadczą o Jej dobrym dotychczasowym dorobku naukowym i dużym zaangażowaniu w prowadzone badania. Projekt badawczy został zrealizowany w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Ryszarda Przewłockiego, który ma wybitne osiągnięcia w badaniach nad endogennymi układami opioidowymi. Wyniki badań stanowiących przedmiot rozprawy zostały już częściowo opublikowane w 2019 i 2022 r. w dwóch pracach, których pierwszym autorem jest Doktorantka, w czasopiśmie o wysokim współczynniku IF: *British Journal of Pharmacology* (IF 7.73) i *Pharmaceutics* (IF 6.072).

Rozprawa doktorska została bardzo starannie opracowana. Każdy jej rozdział, a nawet podrozdział kończy się krótkim podsumowaniem. Układ **WSTĘPU** (25 stron) jest dobrze przemyślany. Po przedstawieniu wielowiekowej historii stosowania opiatów Autorka przytacza dane na temat ligandów i efektów pobudzenia receptorów opioidowych. Następnie dokładnie omawia ważne zagadnienia związane z tematem pracy, a mianowicie proces transdukcji sygnału po aktywacji receptora μ opioidowego z udziałem białka G i β -arestyny-2, znaczenie receptorów μ w nocycepcji, odpowiedzi na stres, w zaburzeniach depresyjnych, a także w rozwoju uzależnień, nie tylko od opioidów. W kolejnym podrozdziale przedstawia korzystne zmiany w działaniu morfiny stwierdzone w badaniach behawioralnych przeprowadzonych u myszy pozbawionych genu kodującego β -arestynę-2 (β -arr 2) lub z ograniczoną jej aktywnością. Dalej omawia efekty nielicznych badań nad selektywnymi funkcjonalnie wobec białka G agonistami receptorów δ i κ , a przede wszystkim wskazuje na

postęp prac w ostatnich latach nad tego typu agonistami rec. μ . Badania te doprowadziły do opracowania pierwszego leku z tej grupy – olicerydyny, który w 2020 r. został zarejestrowany do leczenia ostrego bólu przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków. Wstęp zilustrowany trzema rycinami i uzupełniony dwoma tabelami świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Autorki i w pełni uzasadnia cel podjętych badań.

Głównym **CELEM** pracy było zbadanie potencjalnych efektów terapeutycznych i ocena potencjału uzależniającego trzech wybranych związków: PZM21, SR-14968 i SR-17018. Dla jego realizacji Doktorantka założyła cztery cele szczegółowe, które doprecyzowują bardzo szeroko i ciekawie zaplanowany program badawczy. Badano efekty działania związków na wrażliwość zwierząt doświadczalnych na termiczny bodziec bólowy i rozwój tolerancji na ich działanie antynocyceptywne po wielokrotnym podaniu. Oceniano, czy wielokrotne podanie substancji wywołuje zależność fizyczną i efekty nagradzające oraz czy podanie antagonisty rec. μ spowoduje wystąpienie objawów zespołu odstawienia. Ponadto oceniano działanie uzależniające związku PZM21 w modelu poszukiwania substancji w okresie odstawienia oraz jego wpływ na zachowanie zwierząt w warunkach stresu. Badano jak wymienione związki wpływają na wybrane aspekty działania morfiny: antynocycepcję i rozwój tolerancji na to działanie, objawy odstawienia u zwierząt uzależnionych oraz efekty nagradzające. Dodatkowo wykonano pewne badania behawioralne i biochemiczne, z których dane umożliwiły Doktorantce w lepiej uzasadniony sposób przedyskutować uzyskane wyniki.

W rozdziale **MATERIAŁ i METODY** (17 stron) Autorka przedstawiła dokładnie metodologię badań równocześnie uzasadniając warunki ich przeprowadzenia. Doświadczenia, na które zgody wyraziła II Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie, zostały wykonane na myszach lub szczurach. Szczegółowe dane dotyczące zarówno klasyfikacji zwierząt do różnych typów eksperymentów, jak i dane dotyczące grup eksperymentalnych zostały zamieszczone w dwóch tabelach. Związki będące przedmiotem badań, selektywni funkcjonalnie agoniści rec. μ opioidowych, zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN, a ich czystość enancjometryczną potwierdzono za pomocą analizy widm NMR. Dawki badanych związków ustalano na podstawie obliczonej dawki ED₅₀ w teście odsuwania ogona. W zależności od celu doświadczenia związki podawano dootrzewnowo lub nardzeniowo. Wykonano szereg badań behawioralnych przy użyciu 13 właściwych testów wielokrotnie weryfikowanych w analogicznych badaniach (test odsuwania ogona, test gorącej płytki, model odstawienia precypitowanego naloksonem, aktywność lokomotoryczna, test warunkowej preferencji miejsca, dożylna samopodawanie substancji w klatkach Skinnera, reakcja Strauba, test

wymuszonego pływania, test zawieszenia za ogon, test jasnego/ciemnego pudełka, model warunkowania strachem, labirynt w kształcie litery Y, test rozpoznawania nowego obiektu). W badaniach biochemicznych oceniono wpływ związku PZM21 na stężenie amin w próbkach uzyskanych metodą mikrodializy i aktywację białka G w homogenatach błon komórkowych oraz powinowactwo badanych trzech agonistów do receptorów opioidowych μ , δ i κ .

Uzyskane wyniki zostały zanalizowane przy pomocy właściwych testów statystycznych.

Doktorantka uzyskała znaczną ilość danych, które dokładnie przedstawiła w rozdziale **WYNIKI** (42 strony) oraz rzetelnie udokumentowała na 38 ładnie opracowanych rycinach i w 4 tabelach. Ostatnia tabela stanowi zestawienie wyników uzyskanych w badaniach behawioralnych, co ułatwia analizę tak wielu danych. Trudno omówić wszystkie wyniki, bo liczba wykonanych eksperymentów jest wręcz imponująca. Na pewno ważnym podstawowym stwierdzeniem było wskazanie, że są istotne różnice w działaniu badanych związków, funkcjonalnie selektywnych agonistów rec. μ opioidowych, o różnej strukturze chemicznej. Wykazano, że:

1). SR-14968 i SR-17018 działały silniej antynocyceptywnie i dłużej niż PZM21, który wywoływał efekt pułapowy; 2). SR-14968 i SR-17018 powodowały zespół odstawienia i silniejszą zależność fizyczną niż PZM21; 3). SR-14968 i SR-17018 działały nagradzająco w przeciwieństwie do PZM21, który nie wykazywał potencjału uzależniającego, a nawet osłabiał efekty nagradzające morfiny; 4). wszystkie badane związki nasilały antynocyceptywne działanie morfiny, a SR-14968 i SR-17018 opóźniały nieco rozwój tolerancji morfinowej i osłabiały objawy zespołu odstawienia u myszy uzależnionych od morfiny.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka słusznie wnioskuje, że badane związki mają potencjał terapeutyczny. Związki SR działają bowiem antynocyceptywnie i mogłyby być również stosowane celem łagodzenia objawów odstawienia w przypadku uzależnienia od morfiny. PZM21, częściowy agonista rec. μ , który działał wprawdzie słabiej antynocyceptywnie i powodował szybciej rozwój tolerancji niż dwa pozostałe związki, nie powodował u zwierząt zmian behawioralnych mających naśladować objawy uzależnienia psychicznego i wywoływał tylko słabo wyrażone objawy uzależnienia fizycznego.

DYSKUSJA (27 stron) jest interesująca i bardzo dobrze napisana. Podzielona jest na podrozdziały, w których Doktorantka przedstawia i wyjaśnia różne aspekty wszystkich zagadnień związanych z przeprowadzonymi badaniami. Dokładnie analizuje wyniki badań własnych odnosząc się do prac innych Autorów, którzy w tym samym okresie czasu badali związki będące przedmiotem rozprawy, a wyniki doświadczeń opublikowali w latach 2016 –

2021. Omawia wyniki, które są kontrowersyjne w porównaniu do prac innych Autorów. Doktorantka zwraca uwagę zarówno na korzystne, jak i niekorzystne efekty działania badanych związków i podkreśla istotne różnice w ich działaniu. Podzielam opinię Autorki, że idea funkcjonalnej selektywności dla opracowania lepszych leków opioidowych jest założeniem ważnym, ale nie decydującym i powinna być dokładnie zweryfikowana w dalszych badaniach. Doktorantka wskazuje również na ograniczenia przeprowadzonych badań, stawia pytania i przedstawia propozycje dalszych prac, których celem byłoby dokładne poznanie na poziomie przedklinicznym potencjalnych możliwości wykorzystania badanych związków w terapii. Uzyskane wyniki wskazują, że warto kontynuować badania, gdyż na obecnym etapie prac oceniane związki wydają się być obiecujące.

Przedstawione w końcowej części rozprawy cztery dobrze sformułowane **WNIOSKI** są w pełni poparte uzyskanymi wynikami.

Prosiłabym Doktorantkę o wskazanie, który związek Pani zdaniem jest najbardziej obiecujący w porównaniu do obecnie stosowanych opioidów i jakie dalsze jego badania mogłaby Pani zaproponować.

Dla którego efektu farmakologicznego agonistów rec. μ selektywność względem ścieżki białka G ma Pani zdaniem największe znaczenie ?

Rozprawę doktorską Pani mgr Lucji Kudły oceniam bardzo wysoko. Na uwagę zasługuje ciekawy, dobrze uzasadniony pomysł zrealizowanego projektu, który nawiązuje do nowej hipotezy zakładającej istotne znaczenie selektywności funkcjonalnej ligandów receptorów μ opioidowych dla ich efektów farmakologicznych. Dobrze zaplanowane eksperymenty zostały przeprowadzone przy zastosowaniu właściwego warsztatu badawczego. Znaczna ilość rzetelnie udokumentowanych wyników daje nowe spojrzenie na właściwości funkcjonalnie selektywnych agonistów receptorów μ . Praca została wzorowo zredagowana. Uważam zatem, że oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789 ze zm.) w związku z art.179 ust.1 i 2 ustawy z 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz.1669) i wnioskuję do Komisji ds. Prowadzenia Czynności w Sprawie Nadania Stopnia Doktora przy Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Lucji Kudły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na istotną wartość merytoryczną rozprawy, która wnosi nowe elementy poznawcze do wiedzy na temat zależności efektów farmakologicznych od mechanizmu działania agonistów receptorów μ opioidowych oraz zasługującą na wysoką ocenę bardzo staranną i przemyślaną formę pracy wnioskuję o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakologii Katedry Farmakologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Ewa Obuchowicz

Katowice 9 maja 2022 r.