

Prof. dr hab. n. med. Ewa Obuchowicz
Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii
Śląski Uniwersytet Medyczny

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Cieślik

pt. „*The simultaneous activation of muscarinic receptors and glutamate-release regulating receptors as novel mechanism for antipsychotic medication* “ –
“*Jednoczesna aktywacja receptorów muskarynowych oraz receptorów regulujących uwalnianie glutaminianu jako nowy mechanizm działania leków przeciwpsychotycznych*”

Celem przedstawionej do recenzji rozprawy jest ocena efektu aktywacji receptorów muskarynowych (M₁, M₄, M₅) w modelach zwierzęcych w aspekcie działania przeciwpsychotycznego i ewentualnych działań niepożądanych oraz zbadanie jakie działanie wywoła równoczesne podanie ligandów receptorów muskarynowych i receptorów, których aktywacja hamuje wydzielanie glutaminianu. Pani mgr stosowała ligandy receptorów glutaminianergicznych (mGlu₂, mGlu₄) lub GABAergicznych (GABA_B). Temat pracy jest aktualny. Konieczne jest bowiem poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych w leczeniu schizofrenii, gdyż obecnie stosowane leki przeciwpsychotyczne są mało skuteczne w odniesieniu do objawów deficytowych, afektywnych i poznawczych, jak również, choć w różnym stopniu, ich stosowanie niesie ze sobą ryzyko indukcji szeregu działań niepożądanych.

Rozprawa doktorska została przygotowana **na podstawie czterech prac oryginalnych** opublikowanych w latach 2018 – 2020 w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania: *Psychopharmacology (Berl.)* (IF=3.424) ; *Behavioral Brain Research* (IF=2.770), *International Journal of Molecular Science* (IF=4,183) i *Neuropharmacology* (IF=4.367). **Łączny impact factor 14.744** wskazuje jednoznacznie zarówno na dużą wartość merytoryczną i prawidłowe przeprowadzenie dobrze zaplanowanych doświadczeń, jak

i właściwą interpretację wyników w odniesieniu do danych literaturowych. Jedną z publikacji powstała we współpracy z zespołem farmakologów z Vanderbilt University (USA), co również świadczy o randze badań. Promotor niniejszej rozprawy, dr hab. Joanna Wierońska kierownik Zakładu Neurobiologii Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie od szeregu lat prowadzi badania, które nawiązują do glutaminianergicznej hipotezy schizofrenii. Projekt będący podstawą rozprawy jest kontynuacją wcześniejszych badań Pani Docent i był częściowo finansowy z realizowanego pod Jej kierunkiem grantu OPUS 9. Doktorantka jest pierwszym autorem wymienionych czterech publikacji, a wszyscy współautorzy prac z polskich ośrodków złożyli oświadczenia o ich udziale w badaniach.

Na rozprawę składa się również przedstawione na 43 stronach omówienie wraz z wykazem używanych skrótów, wykazem związków stosowanych w badaniach oraz bibliografią. W bardzo dobrze zredagowanych podrozdziałach Autorka w sposób jasny przedstawia najistotniejsze informacje uzasadniające wybór tematu badań, cel pracy oraz podsumowuje i omawia uzyskane wyniki odnosząc się do danych z piśmiennictwa. Pani mgr omawia pokrótce efekty terapeutyczne i niepożądane stosowanych w terapii leków przeciwpsychotycznych, przechodząc dalej do hipotez neuroprzekaźnikowych schizofrenii – najstarszej zakładającej nadaktywność układu dopaminergicznego w strukturach limbicznych i glutaminianergicznej, która zakłada hipofunkcję receptorów NMDA, czego pośrednim efektem jest wzrost uwalniania glutaminianu. Następnie przedstawia dane wskazujące, że stymulacja układu GABAergicznego i cholinergicznego wywiera pozytywny efekt - hamując uwalnianie glutaminianu.

Przedmiotem zainteresowań Pani mgr jest postulowany od niedawna udział układu cholinergicznego w patofizjologii schizofrenii. Autorka przytacza wyniki badań klinicznych, które wskazują na zmiany dotyczące receptorów muskarynowych w mózgowiu chorych na schizofrenię oraz efekty terapeutyczne wywołane wskutek stymulacji receptorów muskarynowych w tej grupie chorych. Na podstawie wyników badań przedklinicznych omawia rolę receptorów muskarynowych występujących głównie w ośrodkowym układzie nerwowym - M₁, M₄, M₅ w procesach pamięciowych, regulacji aktywności lokomotorycznej, interakcji socjalnych oraz bramkowania sensomotorycznego. Cytując piśmiennictwo z ostatnich lat opisuje efekty działania ligandów wymienionych typów receptorów muskarynowych, jak również efekty stymulacji glutaminianergicznych receptorów metabotropowych grupy II i III oraz receptorów GABAergicznych - GABA_B. Tak przedstawione dane w pełni uzasadniają przeprowadzenie dobrze zaplanowanych badań,

których celem jest uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy podane jednorazowo ligandy receptorów muskarynowych M_1 , M_4 , M_5 wykazują działanie przeciwpsychotyczne w modelach zwierzęcych oraz jaki efekt wywoła równoczesne podanie jednorazowe lub wielokrotne wybranych ligandów receptorów muskarynowych i glutaminianergicznych (mGlu₂, mGlu₄) lub GABAergicznych (GABA_B). Dotychczas podobne badania, zwłaszcza w aspekcie działania wybranych ligandów na objawy deficytowe i poznawcze, nie były publikowane.

Doświadczenia przeprowadzono na zwierzętach (myszy Albino Swiss, myszy CD1, szczury Wistar) w modelu farmakologicznym o uznanej wartości predykcyjnej, w którym zaburzenia behawioralne obrazujące objawy schizofrenii są wywoływane podaniem niekompetycyjnego antagonisty rec. NMDA: (+) MK-801. Objawy wytwórcze wywoływano również podając amfetaminę (dopaminomimetyk) lub 2,5-dimetoksy-4-jodoamfetaminę (DOI; agonista rec. 5-HT_{2A} i 5-HT_{2C}, substancja halucynogenna). Badania były prowadzone w różnych schematach eksperymentalnych. Zastosowano osiem ważnych testów behawioralnych, co pozwoliło na analizę różnych aspektów działania badanych związków (test wzrost aktywności lokomotorycznej indukowanej podaniem MK-801 lub amfetaminy, test wstrząśnięć głową indukowanych podaniem DOI, test interakcji socjalnych, test rozpoznania nowego obiektu, test odroczonej alternacji przestrzennej, test bramkowania sensomotorycznego, test wymuszonego pływania, test wirującego prętu). Wykonano badania z użyciem techniki obrazowania mózgu mikro-PET celem oceny wpływu wybranych związków na aktywność układu dopaminergicznego indukowaną podaniem amfetaminy. Stosując metody elektrofizjologiczne badano jaki jest wpływ ligandu rec. M_4 na uwalnianie glutaminianu. Metoda immunohistochemiczna pozwoliła na pokazanie ekspresji rec. M_1 i M_4 w mózgowiu zwierząt. Badano również penetrację ocenianych związków przez barierę krew-mózg mierząc ich poziom w mózgu. Oceniono działanie następujących ligandów: pozytywnych allosterycznych modulatorów (PAM) rec. muskarynowych – VU0357017 (M_1), VU0152100 (M_4) VU0238429 (M_5); ligandów rec. glutaminianergicznych – LSP4-2022 (agonista mGlu₄), LY487379 (PAM mGlu₂); PAM rec. GABA_B – GS39783, CGP7930.

Do interesujących wyników można zaliczyć stwierdzenie, że:

1). ligandy rec. M_1 , M_4 , M_5 wykazują aktywność przeciwpsychotyczną, ale o różnym profilu działania. Z badanych związków jedynie PAM rec. M_4 skutecznie blokował lub odwracał zaburzenia behawioralne wywołane podaniem MK-801 obrazujące zarówno zaburzenia

wytwórcze, jak i deficytowe oraz poznawcze. Obserwowane efekty działania ligandów były zależne od aktywacji receptora

2). kombinacje badanych ligandów rec. muskarynowych i glutaminianergicznych lub GABAergicznych w dawkach, w których pojedyncze związki nie były efektywne, wywoływały istotne, lecz o różnym profilu, działanie przeciwpsychotyczne. Jedynie łączne podanie ligandów aktywujących rec. M₄ i mGlu₄ blokowało zarówno zaburzenia wytwórcze, deficytowe, jak i poznawcze. Natomiast każda z badanych kombinacji zapobiegała zaburzeniom poznawczym.

3). w przeciwieństwie do leków przeciwpsychotycznych (haloperidol, risperidon) ligandy rec. muskarynowych podawane nawet wielokrotnie lub w połączeniu z ligandami rec. glutaminianergicznych lub GABAergicznych nie powodowały zaburzeń koordynacji ruchowej i hiperprolaktynemii (niektóre w niewielkim stopniu), a więc działań niepożądanych charakterystycznych dla leków stosowanych obecnie w terapii schizofrenii

W dobrze napisanej Dyskusji, którą uzupełniają dwie tabele i dwie ryciny Autorka analizuje zebrany bardzo bogaty materiał doświadczalny. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie, że aktywacja receptorów regulujących uwalnianie glutaminianu – tylko rec. muskarynowych lub równocześnie rec. muskarynowych i glutaminianergicznych lub GABAergicznych wywołuje działanie przeciwpsychotyczne w uznanych modelach zwierzęcych bez ryzyka indukcji objawów pozapiramidowych, które występują w efekcie stosowania szczególnie typowych leków przeciwpsychotycznych. Badania Pani mgr potwierdziły wcześniejsze wyniki prac zespołu dr hab. J. Wierońskiej, że jednoczesna aktywacja dwóch układów neuroprzebieżnikowych hamujących uwalnianie glutaminianu, bez blokady rec. dopaminergicznych, wywołuje efekt przeciwpsychotyczny. Istotnym efektem realizacji projektu było wykazanie działania kombinacji badanych ligandów w aspekcie zaburzeń deficytowych i poznawczych, w przypadku których jedynie leki atypowe są umiarkowanie skuteczne. Leki te, choć w różnym stopniu, wywołują jednakże szereg działań niepożądanych takich jak zaburzenia metaboliczne (zespół metaboliczny, otyłość, nietolerancja glukozy, cukrzyca), zaburzenia krążeniowe, hiperprolaktynemię, ryzyko objawów pozapiramidowych. Opierając się na aktualnym piśmiennictwie, Pani mgr przedstawiła potencjalny mechanizm działania badanych ligandów rec. muskarynowych wskazując na istotne znaczenie interakcji układu cholinergicznego, glutamatergicznego i GABAergicznego dla indukcji efektu przeciwpsychotycznego. Odnosząc się do uzyskanych

danych wykazała, że interakcje farmakokinetyczne nie miały znaczenia dla wyników doświadczeń, w których podawano dwa związki równocześnie.

Poza istotną wartością poznawczą na poziomie badań eksperymentalnych niniejsza rozprawa doktorska ma ważną wartość praktyczną, bowiem proponowany receptorowy mechanizm działania może być wykorzystany do opracowania nowej grupy leków przeciwpsychotycznych o innym profilu działania i lepszej tolerancji aniżeli leki obecnie stosowane. Jednakże o istotnym znaczeniu przedstawionych wyników będzie można mówić dopiero po ich weryfikacji w badaniach klinicznych.

Pytania:

Biorąc pod uwagę przedstawione wyniki i efekty wcześniejszych badań zespołu dr hab. Joanny Wierońskiej, które potencjalne rozwiązanie proponowałyby Pani zastosować - kombinację ligandu rec. M_4 i $mGlu_4$ czy ligandu rec. $mGlu_5$ i $GABA_B$?

Dlaczego Pani zdaniem ważny efekt synergistyczny powodowało jedynie łączne podanie badanych ligandów tylko w dawkach, w których pojedyncze związki nie były efektywne, natomiast nie było tego efektu np. po podaniu jednego związku w dawce aktywnej, a drugiego w nieaktywnej ?

Podsumowując, rozprawę mgr Pauliny Cieślik oceniam bardzo wysoko. Na uznanie zasługuje oryginalny pomysł zrealizowanego projektu, dobry warsztat badawczy, umiejętność analizy wyników i przygotowania na podstawie bogatego materiału doświadczalnego prac, które zostały opublikowane w uznanych czasopismach.

Z przyjemnością zatem stwierdzam, że praca mgr Pauliny Cieślik spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk i mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN wniosek o dopuszczenie Pani mgr do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na istotną wartość merytoryczną dysertacji wnioskuję o jej wyróżnienie.

KIEROWNIK
Zakładu Farmakologii Katedry Farmakologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
E. Obuchowicz
prof. dr hab. n. med. Ewa Obuchowicz

Katowice, dn. 12 sierpnia 2020 r.