

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr farm. KAROLINY PODKOWY

**pt. „WPLYW WYBRANYCH LIGANDÓW METABOTROPOWYCH
RECEPTORÓW GLUTAMINIANERGICZNYCH NA POTENCJALNE
PRZECIWDEPRESYJNE DZIAŁANIE KETAMINY I SKOPOLAMINY”**

wykonanej w Zakładzie Neurobiologii

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor: dr hab. Agnieszka Pałucha-Poniewiera

Depresja jest wyniszczającą chorobą, mającą destrukcyjny wpływ na funkcjonowanie jednostki i społeczeństwa. Leczenie farmakologiczne jest głównym elementem terapii przeciwdepresyjnej, a jej niepowodzenie jest istotnym problemem psychiatrii klinicznej. Na rynku dostępnych jest kilka grup leków przeciwdepresyjnych, których mechanizm działania związany jest ze zwiększeniem neuroprzeżywalności monoaminergicznego. Mimo dużej liczby dostępnych leków, jedynie 50% osób poddanych terapii pojedynczym preparatem uzyskuje remisję. Co więcej, pierwsze efekty leków przeciwdepresyjnych występują najwcześniej po około 2 tygodniach przyjmowania pełnej dawki terapeutycznej. Przełomem w leczeniu depresji odpornej na leczenie było wprowadzenie na rynek farmaceutyczny przez FDA, w marcu 2019 roku, esketaminy (S + enancjomer ketaminy w formie donosowej),

niekompetycyjnego antagonisty glutaminianergicznych receptorów NMDA. Lek daje szybkie i długotrwałe efekty przeciwdepresyjne, ale obdarzony jest licznymi działaniami niepożądanymi (wzrost ciśnienia krwi, halucynacje, zaburzenia funkcji kognitywnych, uzależnienia). W związku z tym może być stosowany tylko pod ścisłą kontrolą lekarza po wyczerpaniu innych możliwości terapeutycznych. Niemniej jednak, zatwierdzenie ketaminy, leku o odmiennym, glutaminianergicznym mechanizmie działania rozszerza wachlarz narzędzi psychiatrów w terapii depresji. Nowym kierunkiem badań stała się również cholinergiczno-adrenergiczna hipoteza depresji, według której do rozwoju depresji dochodzi wskutek zwiększonej transmisji cholinergicznej względem adrenergicznej. Badania kliniczne wykazały korzystny wpływ skopolaminy u chorych na depresję. Jednakże, podobnie jak w przypadku ketaminy, skopolamina obdarzona jest objawami niepożądanymi, które związane są z blokowaniem receptorów cholinergicznych (zaburzenia pamięci, zaparcia, zatrzymanie moczu, zaburzenia widzenia). Równoległe prowadzone badania przedkliniczne sugerują udział receptorów glutaminianergicznych AMPA, zarówno w mechanizmie przeciwdepresyjnego działania ketaminy jak i skopolaminy.

Praca doktorska mgr Karoliny Podkowy poświęcona jest zagadnieniom poszukiwania nowych farmakologicznych strategii leczenia depresji, z użyciem skojarzonego stosowania dwóch preparatów (wykazujących aktywność przeciwdepresyjną) w dawkach podprogowych, wykorzystując zjawisko synergii lub addycji leków. W swojej rozprawie Doktorantka postawiła hipotezę badawczą zakładającą, że połączenie niskich dawek ketaminy czy skopolaminy z ligandami metabotropowych receptorów glutaminianergicznych (mGlu) wykaże efekt porównywalny z uzyskanym po ketaminie czy skopolaminie w wyższych dawkach w monoterapii. Przebadano również działania niepożądane (wpływ na pamięć, koordynację ruchową, aktywność lokomotoryczną) oraz potencjalny mechanizm działania przeciwdepresyjnego takich połączeń. Spośród ligandów mGlu użyto LY341495 (antagonista mGlu2/3) oraz AMN082 (allosteryczny agonista mGlu7). Działanie połączeń ketaminy/skopolaminy z ligandami mGlu porównano z aktywnością odpowiednich związków referencyjnych.

Rozprawa doktorska powstała na podstawie 4 opublikowanych prac. Została przedstawiona w postaci tradycyjnego opracowania liczącego 111 ponumerowanych stron, z typowym układem obejmującym wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz 192 pozycje

piśmiennictwa. Wstęp poprzedzony jest spisem treści. Prace, na podstawie których napisano dysertację, zostały opublikowane w specjalistycznych czasopismach z listy filadelfijskiej takich jak: *Neuropharmacology* (2 prace), *Psychopharmacology* oraz *Behavioural Pharmacology*. Prace są wieloautorskie z udziałem Promotora jako kierownika zespołu. W 3 z nich Doktorantka jest pierwszym autorem, a w 1 pracy drugim, co może świadczyć o Jej dominującym wkładzie w powstanie tych publikacji. Prace przed zaakceptowaniem do druku były, zgodnie z wymaganiami redakcji, ocenione przez ekspertów w danej dziedzinie dlatego trudno dopatrywać się w nich błędów merytorycznych czy niedociągnięć. O ważkim znaczeniu podejmowanych przez Doktorantkę badań świadczy fakt uzyskania finansowania z grantów NCN (OPUS i Preludium) na ich przeprowadzenie. Pani mgr Kinga Podkova otrzymała również stypendium doktorskie (KNOW) finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Dziwi mnie tylko, dlaczego rozprawa nie została przedstawiona w postaci zbioru publikacji z krótkim wprowadzeniem, w którym Doktorant formułuje cele rozprawy.

Wstęp (str. 10-24) stanowi przegląd piśmiennictwa dotyczący ściśle tematyki rozprawy, a więc depresji i hipotez jej powstawania, w tym roli glutaminianu. Tutaj zamieszczony jest również dostępny stan wiedzy na temat przeciwdepresyjnego działania substancji użytych w rozprawie, jak ketaminy, skopolaminy czy ligandów mGlu receptorów.

W rozdziale drugim *Cel pracy* Doktorantka zwięźle i jasno przedstawiła swoje zamierzenia badawcze. Badania były przeprowadzone w sposób kompleksowy. Dlatego oprócz głównego celu pracy, który jest zawarty w tytule dysertacji, Doktorantka zaplanowała również badania uzupełniające, które są rozszerzeniem tematu badawczego i wprowadzają informacje dotyczące objawów niepożądanych stosowanych związków czy potencjalnego ich mechanizmu działania.

Rozdział *Materiały i metody* (str. 26-33) przedstawia warunki przeprowadzonych doświadczeń oraz stosowane metody badawcze. Rozdział ten jest napisany zgodnie z obowiązującymi standardami i w sposób wystarczający aby ocenić prawidłowość eksperymentów i wypracować pogląd na temat wartości naukowej uzyskanych wyników. Opis procedur jest podzielony na podrozdziały zgodnie z *celem pracy*. Badania są zaplanowane starannie a stosowane metody adekwatne do oceny postawionych celów i hipotez badawczych. Umiejętność posługiwania się użytymi w pracy technikami badawczymi świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia pracy w zakresie farmakologii doświadczalnej.

Wykorzystując procedury behawioralne i immuno-/fizykochemiczne Doktorantka uzyskała dużą pulę wyników, które opisała (str. 34-71) i przedstawiła na 38 rycinach. Wyniki są opracowane klarownie. Poza tym, praca posiada bardzo dobrze przygotowaną oprawę graficzną, która zasługuje tutaj na szczególne podkreślenie. Mam natomiast wątpliwości odnośnie wyników przedstawionych na niektórych rycinach (np. 20, 22, 23 – 25 czy 43). W mojej ocenie brakuje na nich grup zwierząt otrzymujących związki podstawowe (brak pełnego planu eksperymentu), które użyto następnie w skojarzeniach. Sprawia to, że trudno w przypadku wyników istotnych statystycznie mówić o addycji czy synergizmie skoro nie zostało zbadane występowanie interakcji krzyżowej pomiędzy tymi substancjami. Nie rozumiem również dlaczego w ocenie tych wyników użyto testu *t*-Studenta bez jakiegokolwiek poprawki na porównania wielokrotne. Nie wiem na jakiej podstawie dokonano wyboru w doświadczeniach dwóch różnych szczepów myszy (eksperymenty ze skopolaminą) oraz dlaczego badania z AMN082 przeprowadzono tylko ze skopolaminą. Poza tymi drobnymi komentarzami, część doświadczalna rozprawy zasługuje na bardzo wysoką ocenę, a uzyskane wyniki stanowią spójną całość i mają duże znaczenie poznawcze i praktyczne.

Dyskusja (str. 72-96) jest zwięzła i skoncentrowana wokół wyników. Doktorantka z dużą znajomością tematu analizuje znaczenie uzyskanych wyników. Ta część pracy doktorskiej została bardzo dobrze opracowana od strony merytorycznej. Dowodzi znajomości piśmiennictwa przez Doktorantkę i umiejętności krytycznej interpretacji uzyskanych wyników. *Dyskusja* zakończona jest *Podsumowaniem* (str. 89-90) wyników, chociaż brakuje w pracy wniosków końcowych.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr Karoliny Podkowy zaliczam wykazanie po raz pierwszy, że (i) połączenie podprogowych dawek ketaminy i skopolaminy z wybranymi ligandami receptorów mGlu (LY341495 i AMN082) wykazuje długotrwały efekt przeciwdepresyjny u zwierząt laboratoryjnych po jednokrotnym (wielokrotnym) podaniu, (ii) działaniu temu nie towarzyszą objawy niepożądane charakterystyczne dla wysokich dawek ketaminy czy skopolaminy, (iii) w przeciwdepresyjne działanie łącznego podania ketaminy i skopolaminy z LY341495 zaangażowane są receptory AMPA natomiast w przeciwdepresyjne działanie skopolaminy i AMN082 włączone są receptory mGlu7.

Ponadto, podtrzymuję sugestię Doktorantki, że skojarzone leczenie ketaminą/skopolaminą i wybranymi ligandami receptorów mGlu (mGlu2/3 i mGlu7) stwarza nowe możliwości terapeutyczne leczenia depresji, ale wymaga potwierdzenia w modelach depresji (np. CMS, CMUS), gdyż w pracy użyto tylko testów skriningowych.

Poza powyższymi komentarzami ważniejszych uwag krytycznych wobec rozprawy nie mam. Moim zdaniem, przedstawiony w rozprawie zarówno opis aktualnego stanu wiedzy jak i badań własnych, dyskusja wyników jak i część eksperymentalna są dobrze zredagowane. Na pochwałę zasługuje również strona techniczna, edytorska i językowa pracy. Piśmiennictwo jest aktualne i zostało odpowiednio dobrane.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wykazuje bardzo wysoki poziom merytoryczny. Drobne uwagi krytyczne przedstawione w recenzji nie wpływają na moją wysoką ocenę wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej. Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa mgr farm. Karoliny Podkowy spełnia bez zastrzeżeń warunki stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy z uwagi na fakt, że prezentuje ona ambitny projekt badawczy i pełną realizację celów w nim postawionych, zawiera oryginalne wyniki pozwalające nakreślić nowy kierunek terapii depresji, uzyskane wyniki zostały już opublikowane w międzynarodowym czasopiśmie w wysokim współczynniku wpływu w postaci 4 oryginalnych prac.

J. Kosiński