



Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum
Zakład Farmacji Klinicznej
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków
tel. (012) 62-05-654

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Podkowy pt.

„Wpływ wybranych ligandów metabotropowych receptorów glutaminianergicznym na potencjalne przeciwdepresyjne działanie ketaminy i skopolaminy”

Promotor rozprawy: dr hab. Agnieszka Pałucha-Poniewiera

Przedstawiona do oceny praca została wykonana w Zakładzie Neurobiologii Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie. Wybór tematu pracy doktorskiej mgr Karoliny Podkowy uważam za uzasadniony, a podjęte badania za celowe i ważne z punktu widzenia poznawczego jak i praktycznego. Wagę podjętego tematu uzasadnia fakt, że choroby psychiczne, w tym depresja, stanowią coraz poważniejszy problem zdrowotny i społeczny, którego częstotliwość występowania wzrasta wraz z postępem cywilizacyjnym. Szacuje się, że około 4,4% populacji światowej cierpi na zaburzenia depresyjne, a z tej liczby nawet 30% przypadków jest diagnozowanych jako depresja lekooporna. Jednym z leków zarejestrowanych do stosowania w depresji lekoopornej u dorosłych pacjentów i wykazującym działanie po krótkotrwałym podawaniu, jest esketamina czyli S-enancjomer ketaminy. Jest to lek tzw. first-in-class („pierwszy w klasie”) o innym, podstawowym, mechanizmie działania przeciwdepresyjnego niż dotychczas opracowane leki przeciwdepresyjne. Jednak stosowanie esketaminy, w postaci donosowego aerozolu, w terapii skojarzonej z doustnym lekiem przeciwdepresyjnym, musi być nadzorowane przez lekarza ze względu na jej działania niepożądane, szczególnie psychozomimetyczne i uzależniające. Takie postępowanie utrudnia pacjentom jak i ich opiekunom przyjmowanie tego leku. Kolejnym lekiem, wybranym do badań przez mgr Karolinę Podkową, jest skopolamina, która w badaniach klinicznych wykazała efekt przeciwdepresyjny już po 4-5 podaniach dożylnych. Działania niepożądane skopolaminy, charakterystyczne dla związków cholinolitycznych,

utrudniają jej wybór jako leku stosowanego w populacji pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi.

Jedną z metod postępowania w terapii jest łączenie leków o różnych mechanizmach działania w celu poprawy efektywności ich działania, obniżenia dawek, co również wiąże się ze zmniejszeniem ich potencjału wywołującego działania niepożądane. W badaniach podstawowych poszukuje się więc związków o nowych mechanizmach działania, które wykazałyby synergiczny mechanizm działania z obecnie stosowanymi lekami, nie tylko przeciwdepresyjnymi. I w ten nurt eksperymentalny znakomicie wpisuje się rozprawa doktorska mgr K. Podkowy. Podjęła się Ona badań na gryzoniach (myszy, szczury) oceniających efekty przeciwdepresyjne łącznego podania ketaminy lub skopolaminy, w podprogowych dawkach przeciwdepresyjnych, z antagonistą metabotropowych receptorów II grupy (mGlu2/3) LY341495 lub allosterycznym agonistą metabotropowych receptorów mGlu7 – AMN082 (test wymuszonego pływania, test zawieszenia za ogon). Efekty łącznego podania związków, mgr K. Podkowa porównała z działaniem samych leków zastosowanych w dawkach wyższych. Ponadto, Doktorantka określiła bezpieczeństwo stosowania niskich dawek ketaminy lub skopolaminy podanych łącznie z powyższymi związkami (również w dawkach podprogowych) lub osobno w następujących testach: aktywność lokomotoryczna, obracającego się pręta i labirynt wodny Morrisa (skopolamina). Celem podjętych badań było również ustalenie mechanizmu synergistycznego efektu przeciwdepresyjnego obu leków i wybranych związków, poprzez określenie udziału, w obserwowanym działaniu, układu serotonergicznego, receptorów AMPA i TrkB oraz aktywności szlaku kinazy mTOR. Doktorantka wykonała także biochemiczne oznaczenia w hipokampie i korze przedczołowej zwierząt poziomów odpowiednich białek (p70S6K, białek gęstości synaptycznej GluA1 i PSD-95) uzupełniając w ten sposób wiedzę na temat możliwego mechanizmu działania badanych połączeń.

Rozprawę doktorską mgr K. Podkowy stanowi praca monograficzna, chociaż znakomita większość prezentowanych wyników została opublikowana w latach 2016-2019, w postaci 4 artykułów oryginalnych o łącznym współczynniku oddziaływania równym 13,946. Układ pracy jest prawidłowy. Doktorantka wyróżniła (i)część teoretyczną zakończoną opisaniem celem zawierającym hipotezę badawczą, (ii)część doświadczalną obejmującą metodykę i wyniki, oraz (iii)przeprowadziła dyskusję otrzymanych wyników zakończoną podsumowaniem. Streszczenie w języku polskim i angielskim, spis skrótów (w liczbie 57) oraz bibliografia w liczbie 190 pozycji uzupełniają rozprawę.

We wstępie teoretycznym Doktorantka wprowadza czytelnika w istotę podjętego tematu badawczego wybierając, z ogromu informacji dostępnych w literaturze, te aspekty, które uzasadniają podjęte przez Nią eksperymenty. To kompendium wiedzy, zawierające umiejętnie dobrane dane pochodzące z badań przedklinicznych i klinicznych, dotyczące patogenezy depresji, ze szczególnym podkreśleniem roli układu glutaminianergicznego w jej rozwoju oraz właściwości przeciwdepresyjnych ketaminy i skopolaminy jak i wybranych do badań ligandów metabotropowych receptorów glutaminianergicznych. Dane te, wzbogacone rycinami, zmodyfikowanymi przez Autorkę z prac naukowych, obrazują w doskonały sposób opisywany temat.

- W podrozdziale 1.3., opisującym właściwości przeciwdepresyjne ketaminy zabrakło, moim zdaniem, informacji na temat zarejestrowanego 5 marca 2019 roku leku Spravato, który zawiera esketaminę jako substancję czynną, szczególnie w aspekcie jej działań niepożądanych i „utrudnień” z jakimi muszą borykać się pacjenci przyjmujący ten lek.
- W opisie właściwości przeciwdepresyjnych skopolaminy (podrozdział 1.4.) Doktorantka, chyba przez nieuwagę, napisała zdanie kończące ten fragment, z którym nie mogę się zgodzić w kontekście powyżej przytoczonych informacji, a mianowicie: *„Stąd przed zastosowaniem skopolaminy w terapii depresji należy określić dokładnie jej wpływ na pamięć i podjąć próbę obniżenia terapeutycznej dawki np. poprzez łączenie z innymi substancjami o podobnym mechanizmie działania”*.
- W opisie właściwości wybranych do badań ligandów, tj. LY341495 i AMN082 jak i w dyskusji, szczególnie w aspekcie badanego mechanizmu działania, zabrakło mi podstawowych informacji dotyczących obydwu związków jak np. ich powinowactwo do glutaminianergicznych receptorów grupy II i III oraz innych receptorów, selektywność związków, właściwości farmakokinetyczne.

Zakres merytoryczny wstępu koresponduje z postawionymi celami pracy. W tym rozdziale Doktorantka zwięźle i w sposób logiczny przedstawiła postawioną hipotezę badawczą. Kolejny rozdział opisuje materiały i metody wykorzystane w pracy eksperymentalnej. Oceniając część doświadczalną uważam, że Doktorantka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem do podjętych zadań, które pozwoliły na realizację zaplanowanego zakresu prac. Dobór zastosowanych metod dowodzi wielokierunkowego, wnikliwego podejścia mgr K. Podkowy do postawionego problemu naukowego, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej i znakomitej organizacji pracy.

- Uwaga Recenzenta dotyczy wpisanej w podrozdziale 3.1. daty opublikowania Ustawy o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych. Prawidłowa data to 15 styczeń 2015 roku, a nie 27 maj 2015 roku, kiedy to przepisy tej ustawy zaczęły obowiązywać.
- W podrozdziale 3.6.3. zabrakło informacji, na których/m szczepach/ie myszy wykonano test aktywności lokomotorycznej?
- W tabeli podrozdziału 3.3. Związki referencyjne zabrakło nazwy, mechanizmu działania i producenta użytej w badaniach substancji ANA-12.

Uzyskane wyniki przedstawiono w aspekcie zróżnicowanych oznaczeń behawioralnych i biochemicznych. Wybrany sposób prezentacji wyników, w większości w postaci rycin, ułatwił czytelnikowi zapoznanie się i całościową ocenę. Odpowiedni podział na prawidłowo zatytułowane podrozdziały, świadczy o wnikliwym przemyśleniu przez Doktorantkę, otrzymanych wyników, a także o Jej doświadczeniu w ich prezentowaniu.

- Uwaga edytorska – na rycinach przedstawiających wyniki uzyskane w zmodyfikowanym teście pływania u szczurów, opis osi Y powinien brzmieć: „czas wspinania” i „czas pływania” podobnie jak opisany „czas bezruchu”, a nie odpowiednio „wspinanie”, „pływanie”. Chociaż należy zaznaczyć, że Doktorantka zamieściła w rozprawie te same ryciny, które były przedstawione w pracach oryginalnych, zmieniając tylko język angielski na polski, i żaden z recenzentów tych prac nie kwestionował takiego sposobu opisu osi. Niemniej, prawdą jest, że mierzonym i przedstawianym parametrem był czas.
- W tytułach podrozdziałów (np. 4.1.2.3.) i rycin (np. 19, 20, 21, 41, 44) brakuje informacji u jakich zwierząt były przeprowadzane testy.
- Szkoda, że nie zbadano wpływu antagonisty receptorów AMPA, związku NBQX na przeciwdepresyjny efekt łącznego podania skopolaminy i AMN082. Taki eksperyment byłby dopełnieniem informacji i dałby odpowiedź na pytanie czy receptory AMPA zaangażowane są w efekty samej skopolaminy czy również związku LY341495.

Dyskusję stanowi poprawnie napisana analiza wyników własnych w odniesieniu do danych z aktualnego piśmiennictwa. Mgr K. Podkowa odpowiednio dobrała uzyskane wyniki i umiejętnie je skonfrontowała z dostępną wiedzą w tym zakresie. Oceniając ten rozdział stwierdzam, że efekty realizacji tego zadania, tak istotnego w pracy naukowej, świadczą o głębokiej wiedzy merytorycznej Doktorantki, jej zdolnościach analitycznych oraz

umiejętności przejrzystego przedstawiania Swoich przemyśleń. Najważniejsze konkluzje z całości badań zostały zebrane w postaci 3 punktów. Zgodnie z tymi wnioskami, w ramach pracy doktorskiej, wykazano u szczurów, że połączenie niskich dawek ketaminy i antagonisty II grupy metabotropowych receptorów glutaminianergicznym (LY341495) wykazuje istotną aktywność przeciwdepresyjną, nie zmieniając podstawowej aktywności lokomotorycznej zwierząt oraz ich koordynacji ruchowej. Mechanizm przeciwdepresyjnego działania ketaminy i LY341495 może być związany z pobudzeniem receptorów AMPA i kolejno aktywacją szlaku mTOR, natomiast nie wykazano istotnej roli receptorów TrkB w tym efekcie. Łączne podanie podprogowych dawek skopolaminy z tym ligandem wywoływało potencjalne i specyficzne działanie przeciwdepresyjne u myszy, pozostając bez wpływu na spontaniczną aktywność lokomotoryczną zwierząt oraz nie zaburzało pamięci przestrzennej myszy. W przypadku wielokrotnych podań powyższego połączenia związków, obserwowano utrzymanie się efektu przeciwdepresyjnego. Wykazano również, że powyższe działanie jest zależne od receptorów AMPA oraz nie jest związane bezpośrednio z neuroprzebieżnością serotoninową. Wykazano również specyficzne działanie przeciwdepresyjne połączenia skopolaminy i allosterycznego agonisty metabotropowych receptorów mGlu7, związku AMN082 u myszy. Łączne podanie obu substancji wydaje się bezpieczne gdyż nie zaburzało pamięci przestrzennej, nie zmieniało spontanicznej aktywności ruchowej zwierząt oraz ich koordynacji motorycznej. Badania z wykorzystaniem myszy transgenicznym pozbawionych receptorów mGlu7 wykazały, że receptory te są niezbędne do wystąpienia efektów przeciwdepresyjnych połączenia skopolaminy i AMN082.

- W tej części rozprawy zabrakło mi podsumowania dotyczącego proponowanego mechanizmu działania ketaminy i skopolaminy wraz z badanymi ligandami. Uważam, że zamieszczenie w „Podsumowaniu” ryciny 4 ze strony 20 części wstępnej poprawiłoby dyskusję i wykazanie jak uzyskane wyniki poszerzyły wiedzę dotyczącą omawianego zagadnienia.

Oceniana rozprawa doktorska dowodzi bardzo dobrego opanowania przez Panią mgr K. Podkową szerokiego wachlarza metod behawioralnych i biochemicznych. Docenić należy kompleksowe podejście metodyczne wykorzystane w doświadczeniach. Wybrany i odpowiednio skompilowany układ pracy umożliwił zapoznanie się z całością w sposób przejrzysty. Dodatkowe zastrzeżenie edytorskie dotyczy błędów stylistycznych (np. str. 21, 77, 89), literowych (np. str. 18, 97) oraz braku konsekwencji Doktorantki we wprowadzaniu i stosowaniu wprowadzonych wcześniej skrótów np. skrót dla serotoniny wprowadzony na str.

11 nie był już stosowany; podobnie skrót dla kory prefrontalnej PFC nie został zastosowany na str. 22, 31 i 32; wprowadzone do wykazu skróty CREB, D-Ser i Glu nie były w tekście w ogóle użyte; skrót dla glicyny został wprowadzony do wykazu, a właściwie niepotrzebny ponieważ słowo „glicyna” pojawiło się w tekście tylko raz. Stosowane skróty takie jak: DAG, PSD95 i symbole związków ACPC, NBQX, MTEP, AP7 powinny być wprowadzone do wykazu skrótów wraz z nazwami chemicznymi. Zabrakło w tekście ponadto powołania się na publikację Fitzjohn'a i wsp. z roku 1998, natomiast pod pozycją Pałucha-Poniewiera i in. z 2014 roku kryją się dwie publikacje, których nie rozróżniono w tekście.

Powyżej przedstawione uwagi i pytania są natury dyskusyjnej i w niczym nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, którą oceniam pozytywnie ze względu na zakres prac badawczych przedstawionych w rozprawie oraz ich charakter nie tylko poznawczy, ale również praktyczny. Wyniki badań zakończone słusznymi wnioskami, świadczą o rozwojowym charakterze dokonanych obserwacji, kompetencjach Kandydatki do stopnia naukowego oraz Jej umiejętności rozwiązywania problemów badawczych. Pragnę podkreślić, że rozprawa doktorska mgr K. Podkowy jest cennym opracowaniem naukowym, stanowiącym rzeczywisty wkład do postępu wiedzy. Wyniki opisane w pracy znacznie rozszerzają możliwości badawcze dotyczące łącznego stosowania leków o działaniu przeciwdepresyjnym z cząsteczkami substancji, które powinny wspomóc ich efekt terapeutyczny i poprawić bezpieczeństwo ich stosowania.

Stwierdzam, że wyniki pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Podkowy są bardzo wartościowe merytorycznie, zawierają niewątpliwy element nowatorstwa i stanowią rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego, a całość opracowania wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w reprezentowanej dyscyplinie naukowej. Uważam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Podkowy spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom na stopień doktora i przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Podkowy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków 17.02.2020

Zakład Farmacji Klinicznej UJ CM

Anna Wesółowska
prof. dr hab. Anna Wesółowska
Kierownik