



Warszawa, 10.11.2024

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. Michała Pasierskiego

pt. "Modulacja farmakologiczna aktywności epileptycznych, badania na modelach zwierzęcych"

Rozprawa doktorska Pana Michała Pasierskiego pt. „Modulacja farmakologiczna aktywności epileptycznych, badania na modelach zwierzęcych” koncentruje się na badaniu mechanizmów działania substancji aktywnych (kwas walproinowy, kapsaicyna, guanfacyna) na aktywność epileptyczną w korze przedczołowej. Praca wpisuje się w obszar neurofarmakologii z potencjalnymi implikacjami terapeutycznymi dla zaburzeń neurologicznych, takich jak ADHD, choroba afektywna dwubiegunowa i padaczka. Na mnie szczególne jako recenzencie wrażenie zrobiła statystyka częstości występowania padaczki (>7 przypadków/1000 osób) przytoczona przez doktoranta co wskazuje na istotność tematyki badań podjętych przez Doktoranta. Tym bardziej, że jak ok. 15% przypadków padaczki nie reaguje na obecnie stosowaną farmakoterapię. Innym ważnym zagadnieniem jest wskazany przez Pana Pasierskiego związek padaczki z szeregiem zaburzeń psychicznych.

Praca została zaprezentowana jako spójny tematycznie zbiór 4 artykułów (tzw. "zszywka") poprzedzony, wykazem publikacji, spisem treści, wykazem stosowanych skrótów, trójstronicowym streszczeniem w języku polskim i angielskim, czternastostronicowym wstępem w języku polskim, bibliografią liczącą 49 pozycji, oraz założeniami i celem pracy, oraz podsumowaniem i wnioskami (po jednej stronie). Do rozprawy załączono też oświadczenia współautorów w których udokumentowany jest przeważający udział Kandydata w powstawaniu wymienionych publikacji. Rozprawę zamyka analiza bibliometryczna publikacji Kandydata wymieniająca 18 wieloautorskich prac oryginalnych. W sześciu z tych publikacji Doktorant jest pierwszym autorem a w innych sześciu jest autorem drugim. Mimo, że nie stanowi to przedmiotu oceny tej rozprawy, świadczy jednak o dużej aktywności naukowej Kandydata.

W streszczeniu Doktorant podsumował wyniki i hipotezy przedstawione w publikacjach wchodzących w skład rozprawy, których opis rozwinął we wstępie. Część publikacyjną rozprawy stanowią cztery publikacje, w tym trzy eksperymentalne, z których każda wnosi istotny wkład do obrazu działania wybranych substancji na aktywność epileptyczną w korze przedczołowej. W szczególności celem przedstawionego cyklu prac



eksperymentalnych było zbadanie wpływu i mechanizmu działania kwasu walproinowego, kapsaicyny i guanfacyny na aktywności typu padaczkowego wywołane w neuronach piramidowych kory przedczołowej.

We wszystkich trzech badaniach zastosowano podobny model eksperymentalny oparty na pomiarach elektrofizjologicznych typu *patch-clamp* krótkich depolaryzacji, którym towarzyszą serie potencjałów czynnościowych indukowanych w neuronach piramidowych skrawków kory przedczołowej. Doktorant na podstawie wcześniejszej literatury przyjął, że są one odpowiednikiem *in vitro* krótkotrwałych wyładowań międzynapadowych (ang. *interictal epileptiform discharges*, IEDs) rejestrowanych *in vivo* przy pomocy zbiorczych rejestracji zewnątrzkomórkowych typu elektrokortykogramu lub elektroencefalogramu. Krótkotrwałe wyładowania międzynapadowe są nieprawidłowymi wyładowaniami elektrycznymi w korze mózgowej, występującymi pomiędzy napadami padaczkowymi, i uważa się, że mogą istotnie przyczyniać się do zaburzeń funkcji poznawczych w padaczce. W swoim wstępie Kandydat podkreślił, że obecność krótkotrwałych wyładowań międzynapadowych jest obserwowana nie tylko w padaczce, ale i innych zaburzeniach neuropsychiatrycznych jak ADHD, choroba Alzheimera, czy choroba dwubiegunowa.

Do badań Kandydat wykorzystał zwierzęcy model *in vitro* w którym skrawki mózgu szczura inkubowano w środowisku o podwyższonym stężeniu jonów potasu (5-10 mM) i bez obecności jonów magnezu w płynie zewnątrzkomórkowym. Takie traktowanie skutkowało niewielką depolaryzacją neuronów i sprzyjało indukcji aktywności epileptycznej typu krótkotrwałych wyładowań międzynapadowych.

Kandydat w rozprawie omówił również inne sposoby wywołania krótkotrwałych wyładowań międzynapadowych w skrawkach mózgowych takie jak: upośledzenie hamowania synaptycznego przez blokowanie receptorów GABA przez użycie takich inhibitorów jak bikukulina lub pikrotoksyna; czy zwiększenie pobudliwości neuronów przez zablokowanie kanałów potasowych inhibitorami takimi jak 4-aminopirydyna czy dendrotoksyna. Metody te Doktorant również zastosował w swoich badaniach.

Pierwsza publikacja pod tytułem "**Valproic acid potently inhibits interictal-like epileptiform activity in prefrontal cortex pyramidal neurons**" opublikowana w 2019 roku w *Neuroscience Letters* stanowi eksperymentalną analizę mechanizmu działania kwasu walproinowego – leku przeciwpadaczkowego o ugruntowanym zastosowaniu klinicznym. Kwas walproinowy jest szeroko opisywanym w kontekście epilepsji (>6000 publikacji w bazie PubMed). Jednakże, przeprowadzono niewiele badań podstawowych typu *patch-clamp* z tym związkiem (w bazie PubMed znalazłem około 70 prac z użyciem haseł "valproic acid" i "patch-clamp"). Badania Doktoranta wykazały, że kwas walproinowy zmniejszał częstotliwość krótkotrwałych wyładowań międzynapadowych w skrawkach kory przedczołowej w sposób zależny od stężenia. Efekt kwasu walproinowego na aktywność epileptyczną był również większy, gdy potencjał błony był bardziej zdepolaryzowany.



Doktorant zaobserwował również, że kwas walproinowy hamuje spontaniczne potencjały postsynaptyczne pobudzające (ang. *spontaneous excitatory post-synaptic potentials*, sEPSP). Jak zauważył Doktorant wskazuje to na szerszy modulacyjny wpływ kwasu walproinowego na transmisję synaptyczną dodatkowo potwierdzony przez zdolność walproinianu do zmniejszenia pobudliwości neuronalnej w piramidowych neuronach kory przedczołowej. Blokowanie krótkotrwałych wyładowań międzynapadowych w tych komórkach przez kwas walproinowy obserwowane przez Doktoranta stoi w sprzeczności z wynikami uzyskanymi wcześniej przez inne grupy na skrawkach hipokampalnych i kory śródwęczowej (Brueckner C. i współ., 2000; D'Antuono M, i współ. 2010). W tym kontekście widzę szczególną wartość publikacji Doktoranta wnoszącą istotny wkład polemiczny do istniejącej wiedzy. W swojej publikacji Kandydat nie zaproponował możliwych przyczyny tych różnic. Czy z perspektywy dzisiejszej wiedzy mógłby się pokusić się o ich wytłumaczenie, czy też postawienie odpowiednich hipotez? Czy zdaniem Doktoranta fakt istnienia takich różnic przemawia za farmakoterapią walproinianem tylko w przypadkach w których krótkotrwałe wyładowania międzynapadowe lokalizują się w korze przedczołowej? Czy kliniczna skuteczność walproinianu jako leku przeciwpadaczkowego, związana jest ze źródłem napadów padaczkowych? Doktorant stwierdza, że cyt. "kwas walproinowy może być korzystny dla pacjentów z zaburzeniami poznawczymi związanymi z IEDs (krótkotrwałymi wyładowaniami międzynapadowymi), nawet w przypadku braku napadów padaczkowych. Istnieją doniesienia sugerujące, że kwas walproinowy może poprawiać deficyty poznawcze związane z IEDs (krótkotrwałymi wyładowaniami międzynapadowymi)". I tu chciałby zapytać się, jakie są skutki uboczne stosowania kwasu walproinowego i na ile w tym kontekście stosowanie kwasu walproinowego u osób u których napady padaczkowe nie występują jest uzasadnione.

W drugiej publikacji zatytułowanej "**Capsaicin inhibits sodium currents and epileptiform activity in prefrontal cortex pyramidal neurons**", a opublikowanej w 2020 roku w *Neurochemistry International*, Doktorant bada wpływ kapsaicyny – znanego głównie z modulacji kanałów TRPV1 – na aktywność epileptyczną i prądy sodowe w neuronach piramidalnych kory przedczołowej. Kandydat wykazał stosując pomiary metodą *current clamp*, że kapsaicyna znacząco hamowała częstotliwość i amplitudy serii potencjałów czynnościowych neuronów. W eksperymentach tych nie zauważono wpływu kapsaicyny na potencjał błonowy neuronów, co jak zauważył Doktorant zasugerował, że to nie kanały TRPV1 były jej celem. Z kolei badania Doktoranta w konfiguracji *voltage clamp* wykazały, że kapsaicyna znacząco hamowała prądy sodowe, przy czym stopień zahamowania był większy przy większych częstotliwościach wywołania tych prądów. Wyniki te sugerują mechanizm blokady kanałów sodowych zależnej od użycia, szczególnie istotny w warunkach dużej aktywności neuronalnej, obserwowanej np. w padaczce. Za przeciwpadaczkowymi właściwościami kapsaicyny przemawiały również zaobserwowane przez Doktoranta przesunięcie krzywej inaktywacji kanałów sodowych w kierunku ujemnych wartości napięcia, skutkujące zwiększoną inaktywacją tych kanałów w spoczynku. Jednakże, analiza wpływu



kapsaicyny na prądy sodowe przeprowadzona przez Doktoranta, ujawniła też potencjalne własności proepileptyczne kapsaicyny związane z przesunięciem krzywej aktywacji tych prądów w kierunku niższych potencjałów błonowych. W tym kontekście zasadne było zbadanie, czy kapsaicyna blokuje aktywności neuronów o charakterze padaczkowym, a zatem czy może wykazywać potencjalne własności przeciwpadaczkowe. I rzeczywiście Doktorant wykazał taki potencjał kapsaicyny w trzech modelach badawczych. Po pierwsze kapsaicyna hamowała krótkotrwałe wyładowania międzynapadowe wywołane przez inkubację skrawków kory przedczołowej w roztworze z 5 mM K^+ i pozbawionym jonów magnezu, tj. w modelu który wcześniej prowadził Doktorant dla badań nad walproinianem. Po drugie kapsaicyna okazała się efektywna w blokowaniu znacznie dłuższych wyładowań epileptycznych, indukowanych w nieobecności jonów magnezu przez inhibitor kanałów potasowych, 4-aminopirydynę. Co interesujące w tym modelu kwas walproinowy był nieefektywny. Po trzecie kapsaicyna okazała się efektywna, choć jak zaznacza Doktorant w mniejszym stopniu, w znoszeniu wyładowań indukowanych przez antagonistę receptora GABA - pikrotoksynę. Poza wartościowymi wynikami eksperymentów, wysoko oceniam zawartą w publikacji dyskusję w tym wnioskowanie o możliwych ścieżkach modulacji przez kapsaicynę kanałów TRPV1 i jej wpływie nie tylko na kanały sodowe, ale także na kanały potasowe (wniosek wysnuty na podstawie analizy wpływu kapsaicyny na aktywność epileptyczną spowodowaną hamowaniem kanałów potasowych przez 4-amidopirydynę). Badania Doktoranta, także w kontekście badań innych naukowców wskazują na dużą nieselektywność działania kapsaicyny, przynajmniej w kontekście kanałów jonowych. Tutaj doktorant sugeruje, że cyt. "struktura kapsaicyny może być przydatna do opracowania nowych leków przeciwpadaczkowych". W jakim kierunku Doktorant pokierowałby tego typu badania? Czy zasadna byłoby zmiana specyficzności jej pochodnych do kanałów innych niż TRPV1 - zwłaszcza w kontekście aktywacji tych kanałów w neuronach czuciowych? Doktorant w rozprawie stwierdza również, że cyt. "Przyszłe badania powinny się koncentrować na szczegółowych mechanizmach działania kapsaicyny, jej skuteczności w organizmach żywych oraz potencjalnych synergicznych efektach z istniejącymi lekami przeciwpadaczkowymi". Kapsaicyna jest związkiem silnie hydrofobowym ($\log P \approx 3.6$). Biorąc to pod uwagę oraz jej aktywność względem dość różnych kanałów zastanawiam się, czy nie wynika ona z modyfikacji przez nią błon biologicznych. Chciałbym zapytać się, o opinie Doktoranta w tym kontekście. Czy jakieś doświadczenia, które przeprowadził mogą świadczyć za lub przeciw takiemu mechanizmowi?

W trzeciej publikacji pt. "**Guanfacine inhibits interictal epileptiform events and sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons**" opublikowanej w 2023 roku, w *Pharmacological Reports*, Doktorant koncentruje się na badaniu guanfacyny – leku stosowanego w leczeniu zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) – pod kątem jej wpływu na krótkotrwałe wyładowania międzynapadowe oraz prądy sodowe w neuronach kory przedczołowej.



Doktorant w rozprawie uzasadnił zasadność badań wskazując, że u osób z ADHD padaczka występuje cztery razy częściej w porównaniu z ogólną populacją, a krótkotrwałe wyładowania międzynaładowe są często obserwowane u pacjentów z ADHD. Dodatkowo Doktorant wskazał, że terapia u pacjentów z ADHD i padaczką stanowi wyzwanie ze względu na pogorszenie napadów padaczkowych przez leki na ADHD. Guanfacyna, agonista receptora alfa-2A-adrenergicznego, jest często stosowana w leczeniu ADHD, mimo, że mechanizm jej działania w mózgu nie jest w pełni zrozumiany. W swojej pracy Doktorant wykazał, że guanfacyna skutecznie i zależnie od stężenia redukuje częstość krótkotrwałych wyładowań międzynaładowych. Co ciekawe efekt ten był niezależny od jej głównego miejsca działania, czyli receptora alfa-2A-adrenergicznego, gdyż taki sam efekt guanfacyny obserwowany był w obecności idazoksanu - antagonisty tego receptora. W dalszej części pracy Doktorant przy użyciu metody *current clamp* zaobserwował hamowanie pobudliwości neuronów przez guanfacynę. Ponieważ, wcześniej obserwowano obniżenie pobudliwości neuronów przez inhibicję prądów sodowych Doktorant wysunął hipotezę, że również guanfacyna blokuje kanały sodowe. Zaproponowana hipoteza okazała się prawdziwa a guanfacyna hamowała zarówno wolno jak i szybko inaktywujące prądy sodowe. Tu szczególnie ciekawa wydaje mi się kolejna hipoteza Doktoranta, który zauważył, że struktura chemiczna guanfacyny przypomina strukturę blokerów kanałów sodowych stosowanych w znieczuleniu miejscowym, tj. miejscowych anestetyków takich jak lidokaina i prokaina. I tu chciałbym zapytać się Doktoranta: W jakim stopniu powinowactwo miejscowych anestetyków do kanałów sodowych różni się od powinowactwa guanfacyny?

Ostatnia czwarta publikacja "**Beneficial Effects of Capsaicin in Disorders of the Central Nervous System**" (*Molecules*, 2022) to doskonały przegląd literatury, który opisuje różnorodne efekty biologiczne kapsaicyny w kontekście terapeutycznym. We stępie Doktorant wymienia wpływ kapsaicyny m.in. na mikrobiom a w efekcie na możliwość terapię nadwagi; potencjalną aktywność przeciwrakową związaną z indukcją apoptozy, czy własności wazorelaksacyjne. W dalszej części pracy przeglądowej Doktorant w szeregu rozdziałów szczegółowo opisuje efekty kapsaicyny w kontekście zaburzeń neurologicznych takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona, padaczka, udary, depresja i migrena. Artykuł omawia zarówno proepileptyczne, jak i przeciwpadaczkowe właściwości kapsaicyny, wskazując, że efekt ten zależy od miejsca działania – proepileptyczne efekty w hipokampie i działanie przeciwpadaczkowe w korze przedczołowej. Autor proponuje, że efekt antyepileptyczny kapsaicyny wynika z jej wpływu na kanały sodowe, co może być podstawą do dalszego rozwoju leków o potencjale przeciwpadaczkowym.

Rozprawa doktorska w formie cyklu publikacji naukowych, z założenia nie wyczerpuje zagadnienie tak jak ta w formie monografii. Uważam, że dla wygody mniej zorientowanego czytelnika było by z korzyścią jednakże, gdyby Doktorant kilka problemów omówił bardziej szczegółowo.



I tak, chociaż Doktorant skupia się na krótkotrwałych wyładowaniach międzynapadowych, nie przedstawia szczegółowego omówienia różnic między tymi wyładowaniami a pełnymi napadami padaczkowymi. Brak precyzyjnego wyjaśnienia tej różnicy ogranicza możliwość oceny, na ile przedstawione wyniki mogą być przekładane na realne scenariusze kliniczne padaczki. Dalej, modele krótkotrwałych wyładowań międzynapadowych oparte na zaburzeniach równowagi jonowej (np. wysoki poziom potasu, brak magnezu) mogą nie odzwierciedlać w pełni mechanizmów patofizjologicznych padaczki w organizmach żywych. Rozprawa jednak nie porusza, w jakim stopniu użyte modele są reprezentatywne dla padaczki u ludzi. Ostatnim problemem, który mógłby zwiększyć wartość rozprawy w moim mniemaniu jest dyskusja o stężeniach substancji aktywnych. I tu chciałbym przy okazji podkreślić w mojej ocenie niezwykle wysoką wartość cyklu prac Doktoranta, który w istocie swojej bada efekty niespecyficzne (ang. "off-target") działania kwasu walproinowego, kapsaicyny i guanafacyny. Odkrywanie nowych leków staje się coraz trudniejsze, a nowe zastosowania znanych substancji są niewątpliwie wyraźnym trendem w dzisiejszej farmakologii. Tu rozprawa mogłaby odnieść się do zależności między dawką a efektem. Jakie stężenia badanych związków osiągane są u pacjentów w praktyce terapeutycznej? Jakie jest okno terapeutyczne? Jakie efekty (on-target, czy off-target) mogą być istotniejsze w danej terapii? Zrozumienie takich zależności miałoby istotne znaczenie dla potencjalnych zastosowań terapeutycznych. Pośrednio w publikacjach Doktorant poruszał te zagadnienia, ale jednak zbiorcze porównanie i dyskusja w rozprawie była na miejscu.

Rozprawa została przygotowana bardzo starannie i tylko z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na nieliczne i niewielkie błędy. I tak w wykazie skrótów znalazłem dwa:

4-AP – 4-aminopirydyna - powinna być "4-aminopirydyna"

NMDA - *N-methyl-D-aspartic acid* (kwas *N-metylo-D-aspartanowy*) powinna być "kwas *N-metylo-D-asparaginowy*".

W podsumowaniu, rozprawa doktorska Michała Pasierskiego dostarcza wartościowych danych na temat działania wybranych substancji na aktywność epileptyczną. Prace eksperymentalne, prowadzone głównie z zastosowaniem technik elektrofizjologicznych (*patch-clamp*) i modeli *in vitro*, umożliwiły precyzyjną kontrolę warunków badawczych oraz ocenę wpływu kapsaicyny, guanafacyny i kwasu walproinowego na krótkotrwałe wyładowania międzynapadowe w izolowanych neuronach. Badania były przeprowadzane na neuronach przyśrodkowej kory przedczołowej, co podkreśla ich znaczenie w kontekście funkcji poznawczych i regulacji emocji. Wysoki stopień powtarzalności wyników oraz rzetelna analiza statystyczna zwiększają wiarygodność uzyskanych danych.

Wyniki rozprawy sugerują potencjalne właściwości przeciwpadaczkowe kapsaicyny, co czyni ją obiecującą alternatywą terapeutyczną w przypadkach padaczki odpornej na klasyczne leki. Ponadto, wyraźny efekt hamujący guanafacyny na prądy sodowe wskazuje na możliwość jej



zastosowania w terapii zarówno padaczki, jak i ADHD. Wyniki te zostały szczegółowo udokumentowane i wsparte analizami statystycznymi.

Przedstawione wyniki mają istotne znaczenie dla badań nad terapiami neurologicznymi, oferując potencjał zarówno w leczeniu padaczki opornej na leczenie, jak i w badaniach nad nowymi zastosowaniami istniejących leków w zaburzeniach neurologicznych. Praca ta stanowi cenny wkład w rozwój nauki i może inspirować dalsze badania w tej dziedzinie.

Ostatecznie stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska lek. Michała Pasierskiego pt. „Modulacja farmakologiczna aktywności epileptycznych, badania na modelach zwierzęcych” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Zwracam się zatem do Rady Dyscyplin Naukowych o dopuszczenie Pana Michała Pasierskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na istotność cyklu recenzowanych czterech prac, poczynione obserwacje oraz hipotezy, w tym zwłaszcza związane z wpływem niespecyficznym (ang. "off-target") badanych związków na kanały sodowe, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

dr hab. Piotr Koprowski