



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Michała Pasierskiego

pt.: „Modulacja farmakologiczna aktywności epileptycznych, badania na modelach zwierzęcych”

Podstawą opracowania recenzji jest, podjęta w dniu 16 października 2024 r., uchwała Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o powołaniu na recenzenta rozprawy doktorskiej autorstwa lek. Michała Pasierskiego. Praca, zatytułowana „*Modulacja farmakologiczna aktywności epileptycznych, badania na modelach zwierzęcych*”, przygotowana została w formie spójnego cyklu czterech artykułów naukowych (trzech prac oryginalnych i jednego artykułu przeglądowego) o następujących tytułach:

A1/ Valproic acid potently inhibits interictal-like epileptiform activity in prefrontal cortex pyramidal neurons Szulczyk B., Pasierski M., Nurowska E. *Neurosci Lett.*, 2019, 708: 134350

IF₂₀₁₉ = 2,274; 70 pkt MEiN

A2/ Capsaicin inhibits sodium currents and epileptiform activity in prefrontal cortex pyramidal neurons. Pasierski M., Szulczyk B. *Neurochem Int.*, 2020, 135: 104709

IF₂₀₂₀ = 3,921; 100 pkt MEiN

A3/ Guanfacine inhibits interictal epileptiform events and sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. Pasierski M, Kołba W, Szulczyk B. *Pharmacol Rep.*, 2023, 75(2): 331-341

IF₂₀₂₃ = 3,6; 100 pkt MEiN

A4/ Beneficial Effects of Capsaicin in Disorders of the Central Nervous System. Pasierski M, Szulczyk B. *Molecules*, 2022, 27(8): 2484

IF₂₀₂₃ (brak danych za 2022 r.) = 4,927; 140 pkt MEiN

Uwzględniając wartości współczynnika oddziaływania, podane dla prac opublikowanych w danym roku, sumaryczny IF cyklu publikacji wynosi 14,722, a nie jak podaje Doktorant 15,195. Natomiast łączna liczba punktów MEiN, liczonych zgodnie z punktacją obowiązującą w roku opublikowania manuskryptu,

to 410 punktów, a nie 450. Artykuły uzupełnione zostały o wprowadzenie obejmujące zagadnienia związane z tematyką pracy doktorskiej, cele badawcze, podsumowanie wyników oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Dodatkowo, do pracy Doktorant dołączył oświadczenia współautorów, którzy uczestniczyli w realizacji badań stanowiących podstawę cyklu publikacji. Zawarte w rozprawie doktorskiej oświadczenia wskazują, że udział Doktoranta w pracach eksperymentalnych był znaczący. Równie wysoko oceniam zaangażowanie Doktoranta w przygotowanie manuskryptów do publikacji. Pan lek. Michał Pasierski jest pierwszym autorem w trzech z czterech prac wchodzących w skład cyklu, jednakże w żadnej z nich nie pełnił funkcji autora korespondencyjnego.

Ocena merytoryczna pracy

Tematyka przedłożonej do recenzji pracy skoncentrowana jest wokół zagadnień dotyczących aktywności napadowej, której jednym z przejawów jest padaczka. Padaczka to przewlekłe schorzenie neurologiczne spowodowane nieprawidłową, nadmierną aktywnością komórek nerwowych manifestującą się gwałtownymi wyładowaniami bioelektrycznymi. Dane epidemiologiczne wskazują, że na schorzenie to cierpi blisko 1% populacji ludzkiej. Współczynnik zachorowalności wzrasta wraz z wiekiem pacjenta i osiąga szczyt po 75 roku życia w związku z występowaniem u osób starszych chorób naczyniowych, zwyrodnieniowych i nowotworów mózgu.

U blisko ⅓ chorych przyczyna padaczki pozostaje nieznana chociaż najczęściej wiązana jest z urazami głowy. Bez wątpienia do padaczki mogą predysponować pewne uwarunkowania genetyczne tj. chociażby nieprawidłowości w strukturze określonych kanałów jonowych (np. sodowych, potasowych, chlorkowych, wapniowych) lub receptorów (np. receptorów GABAergicznym). Typową dla padaczki cechą jest „transformacja” prawidłowo funkcjonującej tkanki nerwowej w tkankę generującą spontaniczną, nawracającą czynność napadową. Kliniczne objawy napadu obserwowane są wówczas gdy nieprawidłowe wyładowania przechodzą z miejsca powstania (tzw. ogniska) na sąsiednie lub odległe rejony mózgu. Najogólniej rzecz ujmując aktywność napadowa jest wynikiem zakłócenia równowagi między hamującą a pobudzającą transmisją synaptyczną ośrodkowego układu nerwowego.

Leczenie padaczki oparte jest przede wszystkim na farmakoterapii. Niestety blisko 15% dorosłych pacjentów i niemalże 25% dzieci nie reaguje na leki przeciwpadaczkowe. W związku z tym trwają intensywne badania nad opracowaniem nowych leków wykazujących działanie przeciwpadaczkowe. Biorąc pod uwagę fakt, że napady padaczkowe obserwowane są w przebiegu licznych chorób neurologicznych i psychicznych (np. depresji, chorobie afektywnej dwubiegunowej, zespole nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi, zaburzeniach ze spektrum autyzmu) poszukiwania nowych związków hamujących aktywność napadową jest wciąż pilną potrzebą. **Tematyka recenzowanej**

pracy wpisuje się we wspomniany nurt badań. Niemniej jednak przedmiotem zainteresowania Doktoranta nie była aktywność napadowa lecz tzw. międzynapadowe wyładowania padaczkowe (*ang. interictal epileptiform discharges, IEDs*) występujące pomiędzy epizodami „klasycznej” aktywność napadowej. Poznanie przyczyn i mechanizmów sprzyjających występowaniu IEDs w neuronach kory przedczołowej (*ang. medial prefrontal cortex, mPFC*) jest o tyle istotne, że stanowią one prawdopodobnie kluczowy czynnik prowadzący do zaburzeń funkcji poznawczych u pacjentów z padaczką.

Celem, opisanych w spójnym cyklu publikacji, badań było określenie wpływu kwasu walproinowego, kapsaicyny i guanfacyny na IEDs rejestrowane w neuronach piramidowych kory przedczołowej. Badania przeprowadzone zostały z użyciem technik *voltage-clamp* oraz *current-clamp* dających możliwość rejestracji wzorca wyładowań, potencjału spoczynkowego i potencjałów synaptycznych komórek nerwowych.

Wpływ kwasu walproinowego na międzynapadową aktywność epileptyczną, indukowaną przez podwyższone stężenie jonów potasu (K^+) oraz brak jonów magnezu (Mg^{2+}) w sztucznym płynie zewnątrzkomórkowym, opisany został w **manuskrypcie A1**. Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowany w badaniach związek redukuje częstotliwość IEDs w sposób zależny od dawki. Właściwości przeciwpadaczkowe walproinianu wynikają ze zdolności hamowania spontanicznych pobudzających potencjałów postsynaptycznych oraz zmniejszania pobudliwości neuronów piramidowych mPFC. Godny odnotowania jest fakt, że w omawianej pracy po raz pierwszy wykazano, iż IEDs mogą być indukowane w neuronach korowych. Co więcej Autorzy podkreślają, że zaproponowany w pracy model badawczy pozwala na rejestrację stabilnych IEDs w korze przedczołowej co umożliwi analizę mechanizmów powstawania aktywności międzynapadowej oraz jej farmakologicznej modulacji. Ponieważ opracowanie nowych leków zdolnych do redukcji IEDs ma kluczowe znaczenie dla poprawy funkcji poznawczych u pacjentów z padaczką opracowanie modelu dającego możliwość testowania nowych kandydatów na leki tego typu należy uznać za spore osiągnięcie.

Tematyka drugiej z prac wchodzącej w skład cyklu publikacji [**manuskrypt A2**] koncentruje się na ocenie potencjału przeciwpadaczkowego kapsaicyny, który został przetestowany w trzech układach doświadczalnych pozwalających na rejestrację: 1/ krótkotrwałej aktywności napadowej, 2/ długotrwałej aktywności napadowej oraz 3/ aktywności o pośrednim czasie trwania.

W badaniach dotyczących krótkotrwałej aktywności epileptycznej zaobserwowano wyraźne hamowanie IEDs po zastosowaniu kapsaicyny. Z kolei w modelu aktywności epileptycznej o średnim czasie trwania kapsaicyna zmniejszała zarówno czas trwania, jak i częstotliwość zdarzeń indukowanych pikrotoksyną, jednak obserwowane zmiany nie były istotne statystycznie. Tylko w badaniach, w których rejestrowano długotrwałą aktywność napadową zaobserwowano całkowite jej zniesienie. Dodatkowo

Autorzy badań wykazali, że przeciwpileptyczne działanie kapsaicyny związane jest z blokadą kanałów sodowych. Zatem wyniki przedstawione w **manuskrypcie A2** dostarczają dowodów na duży potencjał kapsaicyny w hamowaniu różnych form aktywności napadowej.

Trzecia z prac [**manuskrypt A3**] została poświęcona badaniom mającym na celu ocenę wpływu guanfacyny (agonisty receptorów α_2 adrenergicznych stosowanego powszechnie w leczeniu ADHD) na IEDs rejestrowane w neuronach korowych. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że guanfacyna zmniejszała częstotliwość IEDs w sposób zależny od dawki. Zauważono, że przeciwpileptyczne działanie guanfacyny nie wynika z interakcji z receptorami adrenergicznymi, które są zwykle wiązane z efektem terapeutycznym w leczeniu ADHD, lecz ze zdolności do blokowania prądów sodowych. W oparciu o uzyskane wyniki Autorzy twierdzą, że obserwowane po zastosowaniu guanfacyny zmniejszenie pobudliwości neuronalnej oraz hamowanie aktywności epileptycznej w mPFC może przyczynić się do poprawy uwagi i funkcji poznawczych u osób dotkniętych ADHD. Obserwacja ta jest niezwykle cenna, ponieważ u osób z ADHD notowane jest czterokrotnie większe prawdopodobieństwo występowania padaczki niż w populacji ogólnej.

Ostatnia z prac [**manuskrypt A4**] wchodzących w skład monotematycznego cyklu badawczego to artykuł, w którym dokonano przeglądu danych literaturowych dotyczących terapeutycznego potencjału kapsaicyny w leczeniu padaczki oraz innych zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego. Na podstawie zgromadzonych danych Autorzy dowodzą, że przeciwpileptyczne działanie kapsaicyny wynika ze zdolności tego związku do modulowania (hamowania) aktywności kanałów sodowych. W dalszej części pracy zawarte zostały dane potwierdzające zdolność kapsaicyny do poprawy funkcji poznawczych u myszy transgeniczných z chorobą Alzheimery oraz funkcji motorycznych u zwierząt z indukowaną chorobą Parkinsona. Na koniec opisane zostały badania wskazujące na potencjalne zastosowanie kapsaicyny w leczeniu migreny, powikłań poudarowych oraz depresji. W związku z powyższym zawarta w pracy konkluzja, że kapsaicyna jest związkiem o dużym potencjale terapeutycznym, który można wykorzystać w leczeniu chorób neurologicznych i psychicznych po przeprowadzaniu dodatkowych badań przedklinicznych, jest jak najbardziej uprawniona.

Podsumowując wyniki opisane w pracach oryginalnych wchodzących w skład cyklu publikacji można stwierdzić, że przyczyniły się one do poznania mechanizmów farmakologicznych leżących u podstaw IEDs. Co więcej dostarczyły dowodów, że wszystkie zastosowane w badaniach związki wykazują właściwości przeciwpileptyczne. O ile kwas walproinowy i guanfacyna redukowały, krótkotrwałą aktywność epileptyczną (IEDs), to kapsaicyna przejawiała zdolność do hamowania długotrwałej aktywności epileptycznej. Ponadto badania z walproinianem wykazały, że związek ten może łagodzić zaburzenia poznawcze, które stanowią istotne powikłania napadów padaczkowych.

Chciałabym podkreślić, że wyniki badań zawarte w rozprawie doktorskiej zostały już poddane ocenie merytorycznej przez ekspertów podczas procesu publikacji w czasopiśmie naukowych z tego też powodu nie mam większych uwag do przedstawionych w pracy danych eksperymentalnych. Niemniej jednak chciałabym poprosić Doktoranta, aby podczas publicznej obrony:

- 1/ uzasadnił wybór zastosowanych w badaniach związków (jakie przesłanki były brane pod uwagę przy wyborze takich a nie innych związków);
- 2/ ocenił szansę na opracowanie leków przeciwpadaczkowych na bazie kapsaicyny zważywszy na fakt, że związek ten wykazuje nie tylko właściwości przeciwpadaczkowe, ale również proepileptyczne;
- 3/ przedstawił charakterystykę receptorów GABAergiczných, których nieprawidłowe funkcjonowanie może indukować aktywność napadową. Czy wszystkie z receptorów GABAergiczných „w równym stopniu” biorą udział w patogenezie padaczki;
- 4/ skomentował doniesienia, że w leczeniu zaburzeń neurologicznych i psychicznych określony efekt terapeutyczny można uzyskać nie tylko, jak dotąd powszechnie sądzono, poprzez przywrócenie właściwej równowagi neuroprzekazników w ośrodkowym układzie nerwowym, ale także poprzez selektywną modulację sieci neuronalnych. Grupą związków wykazujących zdolności do modulowania aktywności sieci neuronalnych poprzez sprzyjanie procesom takim jak neurogeneza, synaptogeneza, neuritogeneza są tzw. psychoplastogeny. Jak Pan sądzi czy psychoplastogeny mogłyby stanowić nową generację leków przeciwpadaczkowych?

Ocena formalna pracy

Treść rozprawy doktorskiej odpowiada tytułowi pracy oraz sformułowanym celom badawczym. Dobór piśmiennictwa jest poprawny, a zamieszczony w pracy wykaz bibliografii nie budzi większych zastrzeżeń pomimo tego, że nie jest on zbyt bogaty. Precyzyjnie wyselekcjonowane materiały źródłowe pozwoliły na przygotowanie logicznego wstępu i umożliwiły syntetyczne omówienia uzyskanych wyników.

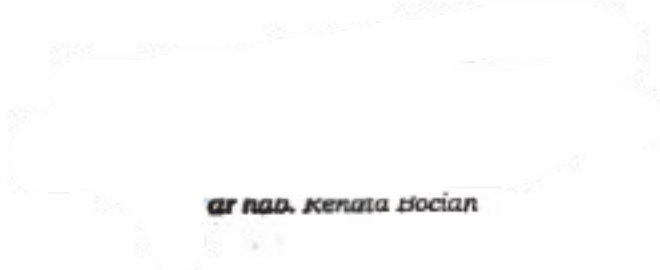
Pod względem językowym opracowanie stanowiące uzupełnienie do załączonych manuskryptów prac oryginalnych i pracy przeglądowej jest w zasadzie poprawne, chociaż Doktorantowi nie udało się uniknąć błędów stylistycznych, interpunkcyjnych, literowych i edycyjnych. W pracy można znaleźć dość liczne sformułowania typu: „...**badania** włączone do rozprawy doktorskiej **zastosowały** kilka modeli aktywności...” (str. 9), „**Wykorzystują one** (w domyśle modele zwierzęce) **podanie** związków wywołujących drgawki...” (str. 15); „Wszystkie oryginalne **prace używały** modelu...” (str. 27). W każdym z wymienionych zdań należałoby dokonać korekty językowej. I tak dla przykładu zamiast „Wszystkie oryginalne prace używały modelu...” powinno być np. „We wszystkich oryginalnych pracach stosowano model/używano modelu...”.

Z kolei na str. 15 i 17 Autor zamieścił odpowiednio następującą informację: „Szczególnie ADHD zwiększa ryzyko padaczki według **kilku badań**, niemal czterokrotnie [8].”, „Uszkodzenie mPFC, powodujące upośledzenie tych funkcji, powiązane z **kilkoma zaburzeniami neurologicznymi i psychiatrycznymi**, w tym depresją, zaburzeniami lękowymi, schizofrenią, zaburzeniami ze spektrum autyzmu, chorobą Alzheimera, chorobą Parkinsona, uzależnieniami i ADHD [23].” W obu przypadkach pomimo stwierdzeń „kilku/kilkoma” Doktorant powołuje się jedynie na jedną pracę! Tego typu błędy w pracach naukowych stanowią dosyć poważne uchybienie.

Mam też uwagę, która dotyczy obecnych w pracy sformułowań będących najprawdopodobniej „kalką językową” anglojęzycznych zwrotów. Sugerowałabym, aby w polskojęzycznych opracowaniach naukowych unikać tego typu sformułowań, tym bardziej, że większość z nich posiada swoje odpowiedniki w języku polskim. I tak np. słowo „raptowne (ang. rapid)” można zastąpić słowami „gwałtowne” lub „szybkie”, a sformułowanie „systemowe podanie (ang. systemic injection)” zapisem „ogólnoustrojowe/obwodowe podanie”).

Podsumowanie i ostateczne wnioski

Zastosowanie właściwych metod doświadczalnych oraz prawidłowe wnioskowanie przyczyniło się do uzyskania przez Doktoranta wartościowych wyników o nowatorskim charakterze. Godny uwagi jest fakt, że otrzymane przez Doktoranta rezultaty mogą wyznaczać nowe kierunki badań farmakologicznych i przyczynić się do opracowania nowej generacji leków, które mogłyby modulować aktywność określonych kanałów jonowych oraz receptorów związanych z patogenezą czynności napadowej, w tym IEDs. Zatem stwierdzam, że w mojej ocenie rozprawa doktorska Pana lek. Michała Pasierskiego spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Z związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Michała Pasierskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Renata Bocian