



Dr hab. Anna Błasiak, prof. UJ
Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 21.12.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Michała Pasierskiego

„Modulacja farmakologiczna aktywności epileptycznych, badania na modelach zwierzęcych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. Michała Pasierskiego, to zbiór czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Tematem rozprawy jest aktywności epileptyczna w korze przedczołowej oraz ocena działania istniejących i potencjalnie nowych leków. Szczególną uwagę poświęcono krótkotrwałym epizodom epileptycznym (wyładowaniom międzynaпадowym), występującym zarówno w padaczce, jak i innych zaburzeniach, takich jak ADHD czy choroba afektywna dwubiegunowa.

Rozprawę rozpoczyna spis najczęściej stosowanych skrótów (tu wkradło się parę błędów; np. 4-AP, powinno być amino-, nie amniopiryna, EPSP, ang. wersja w liczbie pojedynczej, polska w liczbie mnogiej, NMDA, powinno być asparaginowy, nie aspartanowy, niepełne polskie tłumaczenia TRPV), po którym następuje streszczenie w języku polskim i angielskim.

Napisane klarownie Streszczenie, pozwala poznać cel pracy i podsumowanie najważniejszych wyników opisanych w artykułach składających się na rozprawę. W następującym po streszczeniach Wstępie, Autor przedstawia najważniejsze statystyki dotyczące występowania padaczki i wybrane neuronalne mechanizmy leżące u podłoża tej choroby. Autor słusznie wskazuje, że największy odsetek pacjentów cierpiących na lekooporną postać padaczki to dzieci. Wydaje się to być szczególnie istotne w przypadkach przedstawionych w ramach rozprawy badań, które przeprowadzone były szczurach w wieku trzech tygodni. W przypadku szczurów, trzytygodniowe osobniki to zwierzęta, które określa się jako młodociane (juvenile), a ten etap rozwoju porównywany jest z etapem rozwoju dzieci w wieku 3-9 lat (Bell, Endocrinology, 2018, doi: 10.1210/en.2018-00220). W rozprawie zabrakło podkreślenia tego czynnika, i mimo prawdopodobieństwa, że zwierzęta w tym wieku zostały wybrane do badań także ze względu na powszechnie znane ułatwienia wynikające z użycia młodej tkanki nerwowej

w eksperymentach przeprowadzanych techniką patch clamp, wskazanie możliwego związku uzyskanych wyników z wiekiem zwierząt użytych do badań, a tym samym możliwym mechanizmem występującym u dzieci, wydaje się być zasadne.

Model epilepsji wywołanej niskim stężeniem jonów magnezu został opracowany kilka dekad temu i od tego czasu jest szeroko stosowany jako model do testowania leków. Model ten ma istotne znaczenie kliniczne, ponieważ niedobory magnezu mogą zwiększać podatność na napady padaczkowe wywołane bodźcami proepileptycznymi, a nawet powodować napady u ludzi. Ponadto, stężenie magnezu w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym jest niższe u pacjentów z uogólnionymi napadami toniczno-klonicznymi, a magnez podawany dożylnie ma działanie przeciwdrgawkowe i jest stosowany zarówno u ludzi jak i w zwierzęcych modelach epilepsji. Dlatego też, zastosowany w badaniach sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) pozbawiony jonów magnezu, to trafne podejście metodologiczne do wywołania zmian o charakterze epileptycznym.

W kolejnych częściach Wstępu rozprawy, Autor w przystępny sposób streszcza najważniejsze wyniki poszczególnych artykułów wchodzących w jej skład. W odniesieniu do Artykułu 1 „Valproic acid potently inhibits interictal-like epileptiform activity in prefrontal cortex pyramidal neurons” Doktorant wskazuje, że „Kwas walproinowy to dobrze znany lek przeciwpadaczkowy, którego mechanizm działania obejmuje nasilenie transmisji GABA-ergicznej oraz blokowanie kanałów sodowych zależnych od napięcia.” Warto byłoby w tym miejscu wspomnieć, że lek ten powszechnie stosowany jest u dzieci, ale także o szeregu jego działań niepożądanych, w tym o wyszczególnionym (znajdującym się w czarnej ramce) w ulotce leku ostrzeżeniu o zagrażających życiu działaniach niepożądanych, w tym hepatotoksyczności, teratogenności czy możliwości wystąpienia zapalenia trzustki.

Opisując we Wstępie pracy Artykuł 2 „Capsaicin inhibits sodium currents and epileptiform activity in prefrontal cortex pyramidal neurons”, Doktorant pisze „W tym przypadku **zbadaliśmy potencjał terapeutyczny kapsaicyny**”. Wydaje się, że badania przedkliniczne, jakie przedstawił Doktorant nie upoważniają do stwierdzenia, że potencjał terapeutyczny kapsaicyny został zbadany; przeprowadzono ważne eksperymenty *ex vivo*, jednak do zbadania potencjału terapeutycznego w kontekście padaczki potrzebny jest szereg kolejnych badań (badania kliniczne, ocena regulacyjną itp.).

W końcowych akapitach Wstępu możemy przeczytać „Podsumowując, prace wchodzące w skład przedłożonej rozprawy doktorskiej wykorzystywały technikę patch-clamp do modelowania aktywności epileptycznej *in vitro*.” Jednak technika nie modelowała aktywności neuronalnej, a wykorzystano ją do badania tej aktywności.

Lektura rozprawy doktorskiej, w której przedstawiono wyniki badań elektrofizjologicznych, była dla mnie bardzo satysfakcjonująca. W pracy zastosowano wymagającą, ale jednocześnie niezwykle precyzyjną i wiarygodną technikę whole-cell patch-clamp. To metoda wymagająca wielkiej staranności, a także odporności eksperymentatora na niepowodzenia, które są stałym elementem krajobrazu pracy elektrofizjologa. Badania elektrofizjologiczne, takie jak te przedstawione w rozprawie, w literaturze naukowej należą do mniej licznych w porównaniu z innymi badaniami, np. z wykorzystaniem metod biochemicznych, co czyni tę pracę szczególnie cenną. Jednocześnie warto zauważyć, że uzyskane wyniki mogłyby zyskać na wartości, gdyby zostały uzupełnione o dane uzyskane za pomocą innych technik, które oferuje nowoczesna neurobiologia. Niemniej jednak, praca ta stanowi istotny wkład w literaturę naukową, a wykorzystanie techniki patch-clamp zasługuje na uznanie.

W opisie Założeń i celu pracy, Doktorant jasno i zasadnie wskazał wspomniane założenia i wyróżnił cele szczegółowe. Zastanawia jedynie, co Doktorant miał na myśli pisząc, że badania przeprowadzono na **wyizolowanych** z kory neuronach piramidowych w skrawkach mózgu? Warto także wskazać, że stwierdzenie, że „Poznanie mechanizmów działania leków przeciwpadaczkowych na neurony kory przedczołowej może przyczynić się do ograniczenia zaburzeń poznawczych, które stanowią znaczące powikłanie napadów padaczkowych”, jest chyba zbyt dużym uproszczeniem/skrótem myślowym. Samo poznanie mechanizmów nie przyczyni się do ograniczenia zaburzeń poznawczych, może natomiast przyczynić się to opracowania skutecznych/celowanych terapii, które mogą skutkować ograniczeniem tych zaburzeń.

Trzy z czterech przedstawionych artykułów składających się na rozprawę dokorską to prace eksperymentalne, w dwóch z nich Doktorant jest pierwszym autorem. Zbiór zamyka praca przeglądowa, w której pierwszym autorem jest Doktorant. Artykuły przeszły już etap recenzji, poniżej, wraz z krótkim podsumowaniem ich zawartości, przedstawiam pytania, na które nie znalazłam odpowiedzi w ich treści:

Artykuł1

Valproic acid potently inhibits interictal-like epileptiform activity in prefrontal cortex pyramidal neurons - w artykule tym, Autorzy opisali wyniki eksperymentów, w których badali wpływ kwasu walproinowego (VPA) na wyładowania epileptyczne w neuronach piramidowych kory przedczołowej. W warunkach ex vivo wywołano aktywność epileptyczną zależną od receptorów NMDA, którą VPA skutecznie hamował w terapeutycznych stężeniach (20 μ M i 200 μ M). Wyniki przedstawione w pracy wskazują, że kora przedczołowa stanowi odpowiedni model do badania działania leków na wyładowania międzynapadowe.



- Jaka była płeć i szczep szczurów użytych w eksperymencie? Informacje te mają szczególne znaczenie w przypadku badań nad epilepsją, wykazano bowiem znaczące różnice między szczepami szczurów w wywoływaniu status epilepticus oraz późniejszym rozwoju neurodegeneracji, epilepsji i zmian behawioralnych (np. Langer et al., *Epilepsy Research*, 2011, <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2011.06.005>).
- Jaka była liczba użytych zwierząt? Nie jest ona jednoznacznie wskazana, w treści artykułu możemy przeczytać: *In all figures, one recording was performed from one slice. Consequently, n is the number of slices that we used in each series of experiments. Slices for each series of experiments were obtained from 2 or 3 animals*. Trudno jednak tę liczbę ustalić.
- Jednocześnie, w opisie dotyczącym liczby potencjałów czynnościowych, wskazano $n = 104$, czego tutaj dotyczyła liczba „n”? Czy była to liczba skrawków czy potencjałów czynnościowych?
- Jaki był potencjał złącza (junction potential) i czy przedstawione dane były skorygowane uwzględniając jego wartość?
- Czy wywołanie pulsami prostokątnymi potencjałów czynnościowych poprzedzone było sprowadzeniem potencjału błonowego do zdefiniowanej wartości?
- Czy Doktorant spodziewa się, że przy zdepolaryzowaniu badanego neuronu przy pomocy układu rejestracyjnego, efekt w postaci wywołania wyładowań międzynaapadowych byłby podobny do tego, jaki obserwował przy użyciu zwiększonego zewnątrzkomórkowego stężenia potasu (przy brak magnezu w ACSF w obu przypadkach)?
- Jak mierzona była amplituda potencjału czynnościowego i EPSP? Czy dane zliczano ręcznie? Jaki czas rejestracji analizowano?
- Dlaczego wpływ kwasu walproinowego na pobudliwość badanych neuronów weryfikowano w standardowym ACSF, nie w ACSF o zmienionym składzie (jak w poprzednich eksperymentach)?
- W dyskusji Artykułu 1, Autorzy wskazują, “As the epileptiform burst events recorded in this study were of short duration (less than 2–3 s), they may be regarded as interictal-like epileptiform discharges [18]”, jednocześnie jednak, w cytowanej pracy (18) możemy przeczytać: The criterion of duration to discriminate between an interictal and ictal discharge is quite subjective and could be misleading when applied to focal epilepsies. Since a consensus on this issue is still missing, more stringent criteria to define a seizure are required and should be identified. Czy istnieją inne kryteria pozwalające na charakterystykę badanej aktywności?

Capsaicin inhibits sodium currents and epileptiform activity in prefrontal cortex pyramidal neurons – w artykule tym Autorzy wykazali, że kapsaicyna może mieć potencjał przeciwpadaczkowy. W stężeniu 60 μM kapsaicyna hamowała pobudliwość neuronów piramidowych kory przedczołowej, zmniejszając amplitudę późniejszych potencjałów czynnościowych i wzmacniając zależny od użycia blok kanałów sodowych. Obserwowano także przesunięcie krzywej inaktywacji kanałów sodowych w kierunku hiperpolaryzacji. Kapsaicyna skutecznie hamowała zarówno krótkie wyładowania międzynaapadowe, jak i dłuższe wyładowania wywoływane w różnych roztworach proepileptycznych. Wyniki sugerują, że działanie przeciwpadaczkowe kapsaicyny jest związane z jej zdolnością do oddziaływania z napięciowo zależnymi kanałami sodowymi.

- Jak w przypadku Publikacji 1:
 - Jaka była płeć i szczep zwierząt użytych do eksperymentu?
 - Czy przed zadaniem pulsów depolaryzujących, potencjał błonowy sprowadzany był do ustalonej wartości?
- Jaki był powód do zmiany podejścia eksperymentalnego w przypadku badania wpływu kapsaicyny na krótkie i długie wyładowania epileptyczne (osobne grupy kontrolne i badane oraz ekspozycja na kapsaicynę przed zastosowaniem proepileptycznego ACSF)?
- Autorzy opisują wpływ kapsaicyny na pobudliwość neuronalną (wyrażoną liczbą potencjałów czynnościowych w odpowiedzi na depolaryzujący puls prostokątny), jako zmniejszającą pobudliwość, poprzez silne zwiększenie zależnej od użycia blokady szybkich prądów sodowych regulowanych napięciem. Wydaje się, że na przedstawionych zapisach aktywności neuronalnej (Fig. 2, środkowy panel), potencjał błonowy w odpowiedzi na stymulację pulsem prostokątnym w obecności kapsaicyny ma bardziej zdepolaryzowaną wartość niż w warunkach kontrolnych, co może prowadzić do bloku depolaryzacyjnego, a w konsekwencji do zmniejszenia amplitudy i liczby potencjałów czynnościowych. Jestem ciekawa, jak Doktorant odniesie się do takiej interpretacji.
- W Publikacji 1, Autorzy wskazują, że terapeutycznym stężeniem kwasu walproinowego jest stężenie do 200 μM w krwi i mniej niż 100 μM w płynie zewnątrzkomórkowym. W przedstawionym w Publikacji 2 eksperymencie, użyto jednak 400 μM , dlaczego?
- Jaki może być mechanizm stojący za innym efektem ekspozycji badanych skrawków zawierających korę przedczołową na płyn 0 Mg/5 mM KCl i na płyn 0 Mg/4-AP. Czy możliwy, inny mechanizm stojący za wywołaniem różnych zmian w aktywności neuronalnej, może leżeć u podłoża innej wrażliwości wyładowań międzynaapadowych i epileptycznych na kwas walproinowy?

Publikacja 3

Guanfacine inhibits interictal epileptiform events and sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons - w artykule tym Autorzy wykazali, że guanfacyna (agonista receptorów α_2A , stosowany w leczeniu ADHD) hamuje krótkotrwałe wyładowania epileptyczne w neuronach piramidowych kory przedczołowej. Guanfacyna (10 i 100 μM) hamowała częstość tych wyładowań, a efekt utrzymywał się także w obecności antagonisty receptorów α_2 – idazoksanu. Działanie guanfacyny polegało na zmniejszeniu pobudliwości neuronów i hamowaniu zarówno wolno, jak i szybko inaktywujących się prądów sodowych, nie wpływając przy tym na toniczne prądy NMDA. Mechanizm hamowania okazał się niezależny od receptorów α_2A i, jak wskazują Autorzy, może mieć znaczenie kliniczne, ponieważ wyładowania międzynapadowe mogą występować u pacjentów z ADHD, prawdopodobnie przyczyniając się do objawów choroby.

- Jaki był powód zastosowania chlorku choliney w płynie zewnątrzkomórkowym, w eksperymentach, w których badano szybkie prądy sodowe?
- Czy zweryfikowano działanie zastosowanego antagonisty receptorów alfa-2?

Publikacja 4

Ostatnią pracą wchodzącą w skład przedstawianej rozprawy doktorskiej stanowi praca przeglądowa, w której Doktorant jest pierwszym autorem. Praca zatytułowana **Beneficial Effects of Capsaicin in Disorders of the Central Nervous System**, podsumowuje korzystne działanie kapsaicyny, w przypadku różnych chorób ośrodkowego układu nerwowego. Głównym opisywanym mechanizmem działania kapsaicyny jest wpływ na kanały TRPV1 w obwodowych neuronach czuciowych. W pracy zwrócono uwagę także na nowe dane wskazujące na jej liczne korzyści w chorobach neurodegeneracyjnych (m.in. w chorobie Alzheimera i Parkinsona), zaburzeniach nastroju czy udarze mózgu. Jednocześnie wskazano, że efekty kapsaicyny w padaczce pozostają niejednoznaczne – może ona wywierać zarówno działanie pro- jak i przeciwpadaczkowe, co może wynikać z jej wpływu nie tylko na TRPV1, ale także na kanały sodowe zależne od napięcia. Autorzy zwracają uwagę, że wyniki badań na zwierzętach oraz dane kliniczne sugerują znaczący potencjał kapsaicyny w terapii różnych zaburzeń neurologicznych.

Pragnę podkreślić, że publikacje, ukazujące się w kolejnych latach, cechują się coraz wyższym poziomem naukowym, większą złożonością oraz dojrzałą dyskusją.

Podsumowując, stwierdzam, że lek. Michał Pasierski przedstawił wartościową rozprawę doktorską, a wyniki badań elektrofizjologicznych zawarte w artykułach wchodzących w jej skład przyczyniają się do zrozumienia mechanizmów neuronalnych leżących u podłoża działania kwasu walproinowego, kapsaicyny i guanfacydiny. Dostrzeżone drobne uwagi, wątpliwości i postawione pytania z nich wynikające, nie zmieniają pozytywnej oceny pracy.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska 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) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Michała Pasierskiego do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Anna Blaszczak

