



Warszawa, 2022-09-15

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Mgr inż. Marka Pawlika pod tytułem: „Metionino-sulfoksymina jako modulator inicjacji napadów padaczkowych u młodych szczurów w modelu litowo-pilokarpinowym”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Marka Pawlika została wykonana w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Jan Albrecht, promotorem pomocniczym jest dr Marta Obara-Michlewska.

Padaczka i napady drgawkowe są bardzo poważnym problemem społecznym, obarczonym istotnymi konsekwencjami zdrowotnymi dla osoby chorej, w skrajnych postaciach prowadzących nawet do jej śmierci. Wśród wielu objawów charakteryzujących padaczkę poza samymi napadami padaczkowymi, można dodatkowo wyróżnić zaburzenia emocjonalne, w tym stany depresyjne i lękowe a także zaburzenia funkcji poznawczych.

W chwili obecnej w praktyce klinicznej stosuje się liczne leki przeciwpadaczkowe, jednakże w dalszym ciągu znaczny odsetek pacjentów nie odpowiada właściwie na leczenie. Pomimo faktu, iż podłoże biochemiczne napadów padaczkowych jest przedmiotem badań od wielu lat, w dalszym ciągu nie jest wyczerpująco scharakteryzowane i nadal budzi zainteresowanie naukowców na całym świecie. Wśród rozmaitych zaburzeń neurotransmisji stwierdzanych w przebiegu padaczki, obserwuje się nadmierną aktywność szlaków kwasu glutaminowego, będącego głównym neuroprzekaźnikiem o charakterze pobudzającym w układzie nerwowym. Niemniej, mechanizm działania niemal wszystkich, stosowanych w chwili obecnej w praktyce klinicznej leków przeciwpadaczkowych, nie polega na modulacji aktywności układu glutaminianergicznego. W tym kontekście poszukiwanie nowych substancji, których mechanizm opierałby się na wpływie na układ glutaminianergiczny zasługuje na uznanie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska analizuje mechanizm działania przeciwdrgawkowego L-metionyno-D,S-sulfoksyminy (MSO), będącej swoistym inhibitorem syntetazy glutaminy. Doświadczenia przeprowadzono z użyciem zwierzęcego modelu

1 | Strona

padaczki, w którym napady padaczkowe wywoływane są podaniem pilokarpiny, alkaloidu o silnym działaniu pobudzającym receptory muskarynowe, o działaniu obwodowym i środkowym. Badania objęły zarówno efekty behawioralne, elektrofizjologiczne jak i biochemiczne po podaniu MSO. Dodatkowo oceniono możliwość zastosowania pomiaru ekspresji mRNA c-FOS jako biomarkera procesów związanych z drgawkami i epileptogenezą. Procedury eksperymentalne przeprowadzane na zwierzętach uzyskały akceptację Lokalnej Komisji ds. Badań na Zwierzętach (numer: 405/2017). Zdaniem recenzenta wskazane jest dołączenie kopii zgody Komisji Bioetycznej do rozprawy.

Praca doktorska liczy 112 stron. Składa się z części wstępnej omawiającej w ogólnym zarysie podstawowe zagadnienia związane z przeprowadzonym projektem oraz z części, w której zaprezentowane są trzy opublikowane prace stanowiące rozprawę doktorską, dwie eksperymentalne i jedna przeglądowa, w których Doktorant jest pierwszym autorem. W pracach eksperymentalnych Doktorant jest także, (obok Promotora) autorem korespondującym:

- 1) Pawlik MJ, Obara-Michlewska M, Popek MP, Czarnecka AM, Czuczwar SJ, Łuszczki J, Kołodziej M, Acewicz A, Wierzba-Bobrowicz T, Albrecht J. Pretreatment with a glutamine synthetase inhibitor MSO delays the onset of initial seizures induced by pilocarpine in juvenile rats. *Brain Res.* 2021 Feb 15;1753:147253. doi: 10.1016/j.brainres.2020.147253. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33422530.
- 2) Pawlik MJ, Aldana BI, Belfiori-Carrasco LF, Obara-Michlewska M, Popek MP, Czarnecka AM, Albrecht J. Inhibition of Glutamate Release, but Not of Glutamine Recycling to Glutamate, Is Involved in Delaying the Onset of Initial Lithium-Pilocarpine-Induced Seizures in Young Rats by a Non-Convulsive MSO Dose. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 15;22(20):11127. doi: 10.3390/ijms222011127. PMID: 34681786; PMCID: PMC8536987.
- 3) Pawlik MJ, Miziak B, Walczak A, Konarzewska A, Chrościńska-Krawczyk M, Albrecht J, Czuczwar SJ. Selected Molecular Targets for Antiepileptogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 8;22(18):9737. doi: 10.3390/ijms22189737. PMID: 34575901; PMCID: PMC8466306.

Należy zauważyć, że prace stanowiące rozprawę doktorską są pracami wieloautorskimi. Doktorant załączył oświadczenia współautorów o stopniu zaangażowania w prowadzonych doświadczeniach. Niemniej część oświadczeń ma formę oświadczenia jedynie Doktoranta. Moim zdaniem należy dołączyć brakujące oświadczenia poszczególnych autorów w formie indywidualnej. Kwestia roli wszystkich członków zespołu badawczego w przeprowadzonych badaniach i powstawaniu prac, nie może budzić jakichkolwiek wątpliwości.

Jak już wspomniano układ pracy doktorskiej nie jest klasyczny. Rozprawa składa się z następujących części: wykaz skrótów, streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp, cele badań (celu głównego i celów szczegółowych), materiały i metody, podsumowanie najważniejszych wyników i dyskusja, konkluzje, bibliografia (licząca 96 pozycji), kopie artykułów wchodzących w skład rozprawy oraz kopie oświadczeń współautorów publikacji. Wstęp został podzielony na 5 podrozdziałów, w których Doktorant omówił podstawowe zagadnienia dotyczące padaczki skroniowej, model zwierzęcy wykorzystywany w badaniach,



rolę kwasu glutaminowego w mechanizmie drgawek, budowę i mechanizm działania MSO a także możliwości wykorzystania niektórych molekuł jako biomarkerów procesów związanych z epileptogenezą. Wstęp jest napisany odpowiednio z odniesieniami do aktualnego piśmiennictwa. Niemniej, zdaniem recenzenta, Doktorant nie ustrzegł się pewnych uchybień. Fragment wstępu dotyczący padaczki skroniowej jest w niektórych aspektach kontrowersyjny. Po pierwsze padaczka skroniowa nie jest specyficzną postacią padaczki dotykającą wyłącznie dzieci i młodzież. Konsensus kliniczny wskazuje raczej na brak jasnego związku z wiekiem czy płcią. Stwierdzenie, że podłożem padaczki skroniowej są drgawki w dzieciństwie, które później zanikają jest również kontrowersyjne. Faktycznie wykazano, że wystąpienie stanu padaczkowego u dzieci w przebiegu drgawek gorączkowych sprzyja pojawieniu się padaczki skroniowej jednak same drgawki gorączkowe tzw. proste, czyli nie przebiegające z dodatkowymi objawami klinicznymi nie są związane z tym ryzykiem. Dalej wskazanie, że po wstępnych napadach drgawek (gorączkowych?) następuje faza ciszy ale z postępującymi zmianami typu utrata neuronów również nie jest w pełni zgodny z aktualną wiedzą. Nawet w publikacji, na którą się powołuje Doktorant, autorka wskazuje, że zmiany neuropatologiczne takie jak rozplem gleju typu astroglia i zanik neuronów występuje u około połowy osób z napadami skroniowymi. Ponadto należy też dodać, że większość osób, u których występowały drgawki gorączkowe w dzieciństwie, nie ma napadów w wieku dorosłym. Ryzyko rozwoju padaczki u osób, które w dzieciństwie miały pojedynczy napad drgawek gorączkowych wynosi około 2-3%.

Ten fragment rozprawy z pewnością warto skorygować opierając się w większym stopniu na aktualnych danych klinicznych a może nieco mniej na koncepcyjnych pracach dotyczących epileptogenezy lub analizie pacjentów, którzy są kandydatami do leczenia operacyjnego padaczki w wieku dorosłym, ponieważ stanowią oni bardzo specyficzną podgrupę pacjentów.

Następnie w części opisującej model padaczki Li-Pilo, Doktorant omawia ogólnie jego cechy (nieco zbyt lapidarnie). Wskazując równocześnie, że wykorzystanie młodych zwierząt odzwierciedla najczęstszy, młodzieńczy wariant TLE. Wydaje się jednak, że aktualne dane nie w pełni wspierają to stwierdzenie. Tak jak wspomniano powyżej, padaczka skroniowa jest podtypem padaczki występującej u osób w różnym wieku, bez istotnej preferencji zakresu wiekowego.

Podsumowując pomimo wspomnianych powyżej, nieścisłości, wstęp jest napisany kompetentnie, z odwoływaniem się do odpowiednich pozycji piśmiennictwa. Zagadnienia poruszone we wstępie uzasadniają wybór tematu rozprawy a także pozwalają na nadanie odpowiedniego kontekstu literaturowego prowadzonym eksperymentom.

Cel pracy jest ambitny, przedstawiony zrozumiale, nawiązujący do aktualnych badań w podejmowanym zakresie. Niemniej cele sformułowane w sekcji „cele” nie w pełni korespondują z celem badań opisanym w streszczeniach. Konieczne jest ujednoczenie sformułowań w obu wskazanych częściach rozprawy.

Metodyka badań jest bardzo nowoczesna, a Doktorant porusza się po niej sprawnie co ma znaczenie zarówno dla odpowiedniej realizacji celu pracy jak również dla uzyskania wiarygodnych wyników. Wybór metod badawczych jest właściwy i nie budzi większych zastrzeżeń.



Wyniki badań, opublikowane w pierwszej publikacji, wykazały, że zastosowanie MSO powoduje zmniejszenie nasilenia drgawek wywołanych podawaniem pilokarpiny. Efekt ten był głównie widoczny na poziomie behawioralnym z towarzyszącym wpływem na latencję pojawienia się zmian w zapisie EEG. Równocześnie stwierdzono, że efekty behawioralne nie są powiązane ze zmianami zewnątrzkomórkowego poziomu kwasu glutaminowego.

Praca zwraca uwagę swoim metodologicznym zawansowaniem, co należy potraktować z dużym uznaniem. Większość technik użytych w pracy jest trudna a ich opanowanie bardzo dobrze świadczy o warsztacie naukowym Doktoranta. Lektura publikacji nasunęła mi jednak kilka wątpliwości. Po pierwsze zwraca uwagę, że zwierzęta poddane działaniu pilokarpiny zaprezentowały drgawki o średnim nasileniu w skali Racine'a z medianą około 3 co wskazuje, że większość zwierząt nie miała napadów toniczno – klonicznych. Czy należy rozumieć, że inne analizy np. biochemiczna były wykonane łącznie dla całej grupy zwierząt otrzymujących pilokarpinę, niezależnie od nasilenia napadów? Populacja zwierząt z napadami 4-5 stopnia jest jakościowo różna od zwierząt z napadami w stopniu 2 czy 3. Wydaje się istotne zaprezentować wyniki dla poszczególnych niezależnie dla zwierząt z różnym nasileniem drgawek. Kolejna kwestia dotyczy wybranej dawki MSO. Wyniki badania wskazują, że MSO nie obniżało poziomu kwasu glutaminowego a co więcej jego poziom, choć nieistotnie, był podwyższony w relacji do kontroli. Co było podstawą wyboru tej specyficznej dawki? Czy podjęto próby dokonania analizy dawkozależności efektu MSO? Być może wyższa dawka miałaby bardziej klarowny wpływ na nasilenie drgawek? Zwraca również uwagę wpływ samego MSO na zapis EMG. Czy wobec tej obserwacji, ocena behawioralna drgawek nie była zaburzana przez miorelaksacyjny efekt MSO? Doktorant dokonał również analizy szybkości pojawiania się objawów behawioralnych drgawek na zwierzęta o wczesnym, pośrednim i późnym pojawieniu się drgawek. Nie jest jednak jasne w jaki sposób ustalono poszczególne przedziały czasowe.

Druga publikacja poddaje analizie mechanizm działania MSO w modelu pilokarpinowym. Przeprowadzone przez Doktoranta eksperymenty wykazały, że w przypadku MSO stosowanym w niskiej dawce, jego mechanizm działania opiera się głównie na hamowaniu synaptycznego uwalniania kwasu glutaminowego. Również w przypadku drugiej publikacji zwracają uwagę zastosowane metody badawcze, bardzo dobrze świadczące o warsztacie naukowym Doktoranta. Pewne wątpliwości budzą natomiast, wyniki behawioralne zaprezentowane w pracy. Na rysunku numer 1 w publikacji zaprezentowano dane wskazujące na przeciwdrgawkowy wpływ MSO. Wykazano, że średnie nasilenie drgawek jest mniejsze w grupie otrzymującej MSO. Jednak dokładniejsza analiza obu podgrup zwierząt (ocenianych do 15 i 60 minut od podania pilokarpiny, rysunek 1 G) wskazuje, że efekt jest bardzo słaby. Porównanie obu podgrup MSO-Pilo (long i short period) w 15 minucie wskazuje, że mają one zdecydowanie odmienny obraz, chociaż powinny być zbliżone. Co więcej analiza grup Pilo vs MSO-Pilo w 60 minucie wskazuje na większą liczbą zwierząt z uogólnionymi drgawkami, odpowiednio 3 i 5, a nasilenie drgawek w podgrupie otrzymującej MSO wydaje się być większe. Co mogło, zdaniem Doktoranta przyczyną takiego obrazu?

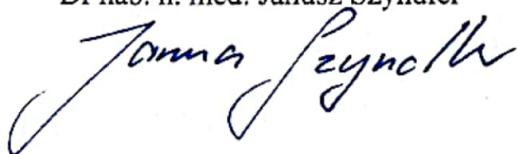
Ostatnia praca przedstawiona w ramach rozprawy jest to publikacja przeglądowa dotyczącego potencjalnych punktów uchwytu dla interwencji hamujących epileptogenezę, która w szeroki sposób omawia znaczenie wielu molekularnych punktów uchwytu dla

interwencji blokujących postęp epileptogenezy. Pracę Doktorant uzupełnił o wyniki własne dotyczące analizy mRNA genu natychmiastowej odpowiedzi c-Fos. Wykazano, że drgawki są związane z silną ekspresją c-Fos jednak nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją c-Fos mRNA a nasileniem drgawek. Autor wskazuje na c-Fos mRNA jako potencjalny punkt uchwytu dla działań hamujących epileptogenezę. Postawiona teza jest zdaniem recenzenta zbyt daleko idąca. Czy można oczekiwać, że ekspresja c-Fos będzie markerem epileptogenezy w kontekście bardzo szerokiej grupy bodźców aktywujących c-Fos? W jaki sposób można odróżnić aktywację wynikającą z toczących się procesów epileptogenezy od wywołanej bólem lub stresem. Co więcej pomiar mógłby być użyteczny w przypadku pomiaru c-fos we krwi, czy w takim przypadku moglibyśmy mieć pewność że obwodowo oceniany c-Fos jest pochodzenia ośrodkowego?

W podsumowaniu cyklu prac Doktorant stawia tezę że MSO może stanowić nowy lek przeciwpadaczkowy w szczególności w połączeniu z aktualnie stosowanymi środkami. Czy istnieją jakieś dane wskazujące na taką możliwość? Zdaniem recenzenta potencjał MSO w tym zakresie jest raczej skromny biorąc pod uwagę jego stosunkowo niewielki wpływ na ekspresję drgawek i zapis EEG. Podobnie postulowane zastosowanie c-Fos jako markera biochemicznego epileptogenezy jest wątpliwe. Zabrakło także nakreślenia planu dalszych badań dotyczących MSO o ile Doktorant planuje kontynuowanie tego tematu w przyszłości.

Podsumowując, należy stwierdzić, że uchybienia w pracy nie umniejszają jej wartości. Szczególną uwagę zwraca bardzo bogaty warsztat metodologiczny Doktoranta co wskazuje na duże umiejętności i doświadczenie w prowadzeniu pracy badawczej co bardzo dobrze rokuje na przyszłość. Stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Marka Pawlika prezentuje wysoki poziom naukowy i odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnoszę do Wysockiej Rady Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Marka Pawlika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Janusz Szyndler



Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1B, 02-091 Warszawa

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej
ul. Banacha 1b; 02-097 Warszawa
tel. (+48) 22 116 6116, faks: (+48) 22 116 6202