

Kraków, 03-08-2022

Recenzja pracy doktorskiej

Mgr inż. Marka Pawlika

pt.

**Metionino-sulfoksymina jako modulator inicjacji napadów padaczkowych u młodych
szczurów w modelu litowo-pilokarpinowym**

Epilepsja (padaczka) jest jednym z najczęściej występujących schorzeń neurologicznych, dotykającym około 1% populacji. Jej najczęstszą postacią jest padaczka skroniowa (temporal lobe epilepsy – [TLE]), która jest najbardziej lekoopornym rodzajem tego schorzenia, a nasze możliwości jego leczenia nie są wystarczające. Dlatego podjęcie przez doktoranta tego tematu jest bardzo na czasie. Doktorant pracuje w grupie prof. Jana Albrechta który w swojej tematyce badawczej często porusza temat transmisji glutaminianergicznej, która spełnia ważną rolę w epileptogenezie,

Przedłożona mi do recenzji 112 stronicowa rozprawa mgr Marka Pawlika napisana w języku angielskim jest omówieniem 3 anglojęzycznych publikacji w których doktorant odgrywa wiodącą rolę, jak wynika z oświadczeń jego oraz 13 współautorów zawartych na 13 ostatnich stronach rozprawy.

Rozprawa zawiera 2 stronicowy abstrakt po polsku i po angielsku oraz zawarty na 15 stronach anglojęzyczny opis tych trzech publikacji. Anglojęzyczne streszczenie rozprawy zawiera 3 stronicowe wprowadzenie, jedno- stronicowy cel, 3 stronicową metodykę, pracę kończy 3 stronicowe podsumowanie najważniejszych wyników oraz *Wnioski* zawarte na 1

stronie . Bibliografia zawiera 96 pozycji. Załączone publikacje zawarte są na 57 stronach. Na stronach od 43 do 100 zamieszczone są pełne teksty tych prac. Dodano obszerny i wyczerpujący wykaz skrótów, który ułatwia czytanie tekstu.

Prace wchodzące w skład rozprawy:

1. Pawlik, M.J., Obara-Michlewska, M., Popek, M.P., Czarnecka, A.M., Czuczwar, S.J., 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. (2021) *Brain Research*, 1753, art. no. 147253, cytowana 2 razy.
2. Pawlik, M.J., Aldana, B.I., Belfiori-Carrasco, L.F., Obara-Michlewska, M., Popek, M.P., Czarnecka, A.M., 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 . (2021) *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (20), art. no. 11127, .
3. Pawlik, M.J., Miziak, B., Walczak, A., Konarzewska, A., Chrościńska-Krawczyk, M., Albrecht, J., Czuczwar, S.J. Selected molecular targets for antiepileptogenesis. (2021) *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (18), art. no. 9737, cytowana 2 razy.

Wszystkie trzy są publikowane w wartościowych czasopismach o wysokim IF i cytowane są 4 razy. Ponieważ opublikowane zostały w roku 2021 liczba cytowań nie może być wysoka

Autor, w badaniach na przeprowadzonych młodych szczurach testował hipotezę, że hamowanie syntezy glutaminy (Gln) w astrocytach przez podanie L-metionilo-D,S-sulfoksyminy (MSO) –związku który jest silnym i nieodwracalnym, a także swoistym inhibitorem syntetazy glutaminy (GS), może osłabić lub zatrzymać aktywność napadową mózgu w inicjacyjnej fazie choroby (padaczka). Gln, jest bezpośrednim prekursorem glutaminianu (Glu). Nasiloną transmisja glutaminianergiczna jest ważnym elementem

napadów padaczkowych. Glu jest bowiem wiodącym mózgowym neuroprzekaznikiem o charakterze pobudzającym, który tworzy 60% komórek nerwowych naszego mózgu.

Autor wykorzystał litowo-pilokarpinowy model TLE, gdzie młodym, 23 dniowym szczurom podawany jest na dobę przed pilokarpiną - lit w dawce 222 mg/kg (pozwala to zmniejszyć ilość pilokarpiny (Pilo) potrzebną do wywołania stanu padaczkowego (status epilepticus-SE), do dawki 40 mg/kg, co znacznie zmniejsza śmiertelność zwierząt. 30 min przed Pilo podawana jest metyloskopolamina by zmniejszyć obwodowe działanie cholinomimetyczne tej pierwszej.

W swoich badania autor wykazuje, że MSO w dawce 75/mg/kg podana na 150 min przed Pilo, znacznie opóźnia początek ataku drgawek u młodych szczurów zarówno na poziomie behawioralnym jak i elektroencefalograficznym. Zwierzęta, które otrzymały MSO wykazywały znacznie zmniejszone objawy behawioralne napadów, mierzone skalą Racinea . MSO wyraźnie zwiększyło liczbę zwierząt bez napadów oraz wyraźnie zmniejszyło siłę skurczu mięśni w badaniach elektromiograficznych (EMG).

Pomiary stężeń zewnątrzkomórkowego Glu *in vivo* wykonane za pomocą bio-czujników zaimplantowanych do hipokampa nie wykazały żadnych zmian wywołanych podaniem MSO. Nie było również zmian w badaniach metabolicznych, które nie wykazały żadnych istotnych zmian w syntezie Glu *de novo* pomiędzy grupami leczonymi MSO i nieleczonymi, wyniki te wskazują, że MSO wywierało swoje działanie poprzez mechanizm inny niż hamowanie GS.

Praca nr. 2. W badaniach *ex vivo* w skrawkach mózgu szczurów (którym podano MSO) podczas indukowanej jonami K⁺ depolaryzacji wykazano znaczne zmniejszenie wpływu [³H]D-Asp, analogu Glu który nie jest metabolizowany. MSO nie wpływał w sposób znamienny na wychwyty [3H]D-Asp. Wskazywać to może na zmniejszenie

uwalniania glutaminianu jako punktu uchwytu działania MSO. Wyjaśnienie mechanizmu tego działania wymaga dalszych badań.

Praca nr. 3 stanowi obszerny przegląd opisujący stan wiedzy na temat molekularnych celów zapobieganie epileptogenezie. Zawiera jednak również badania własne dotyczące analizy korelacji ekspresji mRNA dla c-Fos z parametrami behawioralnymi napadów padaczkowych u szczurów w modelu Li-Pilo, po podaniu MSO. Stwierdzono ujemną korelację w poziomie ekspresji mRNA dla c-Fos a okresem upływającym po wstrzyknięciem Pilo i początkowym wystąpieniem napadu. Była też tendencja MSO do osłabienia odpowiedzi c-Fos.

Nie zgłaszam zastrzeżeń do przeprowadzonych eksperymentów. Uważam że eksperymenty były one słuszne i logiczne oraz, że doprowadziły to znaczącego poszerzenia naszej wiedzy na temat działania MSO jako modulatora inicjacji napadów padaczkowych. Autor wykazał się opanowaniem metodyki badań behawioralnych, biochemicznych i ekspresji genów, prowadzone były również badania elektromiograficzne i elektroencefalograficzne. Bardzo pozytywnie oceniam współpracę z wiodącym polskim zespołem w dziedzinie przedklinicznych badań nad epilepsją kierowanym przez prof. Czuczvara oraz z badaczami z Uniwersytetu w Lund i w Kopenhadze.

Poniżej wypunktowałem drobne niedociągnięcia, które zauważyłem w trakcie czytania rozprawy jak również swoje uwagi

1. Abstrakt polski str. 11 transmisja glutaminianowa albo glutamatergiczna a nie glutaminergiczna (glutamina nie jest neurotransmiterem)
2. Figura 1 – astrocyt (bardzo ładny) ale prawie nie różni się od neuronu.
3. Metody: punkt 3.2 – Pilo. stymuluje wszystkie podtypy receptorów muskarynowych (od M1 do M4) nie tylko receptor M1 (patrz Figueroa i wsp, 2009, JPET,328/1, 331-342)

4. Brakuje mi próby połączenia MSO z jakimś znanym lekiem przeciwpadaczkowym by zbadać czy MSO nasili jego działanie. Mogło by to zapewnić pracy wymiar praktyczny.

Uwagi te w żadnej mierze nie wpływają na jakość rozprawy. Na zakończenie podkreślam, że nie mam żadnych wątpliwości, że niniejsza rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom na stopień doktora. Dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Marka Pawlika do dalszych etapów przewodu doktorskiego (na podstawie stosownych artykułów ustawy o stopniach i tytule naukowym).

Prof. dr hab. Andrzej Pilc