



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Krzysztof Janeczko
Pracownia Neuropatologii Doświadczalnej
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

Kraków, 16.09.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marka Pawlika pod tytułem
*Methionine sulfoximine as a modulator of initial seizures in the lithium-pilocarpine model
in juvenile rats.*
(*Metionino-sulfoksymina jako modulator inicjacji napadów padaczkowych u młodych szczurów
w modelu litowo-pilokarpinowym*)

Rozprawa została przygotowana po opieką naukową prof. dra hab. Jana Albrechta, promotora, oraz dr Marty Obara-Michlewskiej, promotora pomocniczego, w Zakładzie Neurotoksykologii Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma 112 stron i zawiera część wprowadzającą oraz trzy tematycznie spójne artykuły naukowe. Dwa z nich przedstawiają wyniki badań doświadczalnych, a jeden ma charakter przeglądowy, ale dodatkowo prezentuje rezultaty badań wcześniej nie publikowane. Artykuły te, ukazały się drukiem w roku 2021, w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Ich łączny Impact Factor wynosi 15,846, a więc jest bardzo wysoki. Ponieważ są to prace wieloautorские, do rozprawy zostały dołączone pisemne oświadczenia współautorów. Wynika z nich, że Pan Marek Pawlik uczestniczył aktywnie w planowaniu badań, wykonywał zabiegi na zwierzętach, badania *ex vivo*, badania biochemiczne oraz statystyczną analizę wyników. Brał też czynny udział w przygotowaniu manuskryptów i korespondował z redakcjami czasopism. Jest pierwszym autorem każdej z tych prac, a w przypadku dwóch – autorem korespondującym. Świadczy to o wysokim poziomie zaangażowania w pracę naukową, nie tylko w zakresie jej wykonania, ale również interpretacji otrzymanych wyników i zdolności do obrony własnych argumentów. Udział dwóch współautorów, pracowników zagranicznych placówek badawczych, został sprecyzowany i podpisany przez samego Doktoranta. Rozumiem, że zajmowali się oni zastosowaniem jednej z wielu wyspecjalizowanych technik pomiarowych na materiale uzyskanym przez Doktoranta.

Część wprowadzająca rozprawy, napisana w języku angielskim, obejmuje 35 stron wraz ze szczegółowymi spisami treści i użytych skrótów oraz streszczeniami w języku angielskim i polskim.

Ponieważ aktywność epileptyczna mózgu wiąże się ze wzrostem poziomu glutaminianu, należało spróbować zmniejszyć efektywność działania mechanizmu, który ten neurotransmitter produkuje. Koncepcja ta może mieć znaczenie dla rozwoju metod leczenia epilepsji, a więc inspirowała badania, w których Doktorant uczestniczył. W tym celu, za pomocą metionino-sulfoksyminy (MSO), blokowano aktywność syntetazy glutaminy i badano jak zmienia się podatność mózgu na drgawki w modelu litowo-pilokarpinowym. W części wstępnej rozprawy znajduje się precyzyjne wyszczególnienie najważniejszych wyników tych badań, które są nowością dla bieżącego stanu wiedzy o mechanizmach genezy epilepsji. Wydaje się, że wyniki te można podsumować tak: Zahamowanie aktywności syntetazy glutaminy, a więc cyklu przemian glutamina-glutaminian (GGC), prowadzi do opóźnienia wystąpienia pierwszych uogólnionych drgawek w modelu litowo-pilokarpinowym, jednak nie poprzez wpływ na prekursory w cyklu produkcji glutaminy, ale raczej na nieznane procesy uwalniania glutaminianu. Dodatkowo wykryto, że im większe jest opóźnienie wystąpienia pierwszych uogólnionych drgawek, tym niższa jest ekspresja c-Fos mRNA.

Wstępna część rozprawy zawiera krótką charakterystykę padaczki skroniowej i jej litowo-pilokarpinowego modelu oraz roli glutaminianu i cyklu jego produkcji w napadowej pobudliwości mózgu. Opisane jest potencjalne znaczenie MSO jako inhibitora syntetazy glutaminy. Dalej, wśród biomarkerów epileptogenezy, jest wymieniony protoonkogen c-Fos, jako marker wczesnej aktywności drgawkowej. Po skróconym opisie technik badawczych następuje rozszerzone streszczenie i zarazem skondensowana dyskusja wyników. Pięć konkluzji poprzedza prezentację trzech opublikowanych artykułów.

Artykuł 1. Pawlik M, Obara-Michlewska M, Popek M, Czarnecka AM, Czuczwar SJ, Łuszczki J, Kołodziej M, Acewicz A, Wierzba-Bobrowicz T, Albrecht J. 2021. Pretreatment with a glutamine synthetase inhibitor MSO delays the onset of initial seizures induced by pilocarpine in juvenile rats. *Brain Research*, 1753:147253. doi: 10.1016/j.brainres.2020.14725.

Ten artykuł przedstawia wyniki badań wpływu MSO, na przebieg napadów drgawkowych wywołanych pilokarpiną skojarzoną z litem. MSO jest specyficznym inhibitorem syntetazy glutaminy, hamuje cykl przemiany glutaminy w glutaminian, dlatego badane były zmiany poziomu ekspresji GS, jej aktywności oraz pozakomórkowej koncentracji glutaminianu. Wyniki tych badań stanowią tło dla wyników przedstawionych w artykułach następnych. Założono, że podanie MSO obniży natężenie symptomów drgawkowych behawioralnych i w obrazie EMG oraz zmniejszy moc

sygnału EEG. Zjawiska te rejestrowano w ciągu godziny po wywołaniu drgawek pilokarpiną, które poprzedzało podanie MSO.

Okazało się, że nastąpiło statystycznie istotne opóźnienie pierwszych uogólnionych drgawek. Gdy osiągnęły maksymalne natężenie, pojawiło się 45-minutowe plateau, na całym przebiegu niższe u zwierząt traktowanych MSO i ze statystyczną istotnością różnic w trzech punktach. Wydaje się, że gdyby zsumowano wszystkie oceny tylko z tego okresu, to efekt obniżenia byłby wyraźniejszy. W konsekwencji podania MSO, znacznie zmalała liczba zwierząt wykazujących wczesne, uogólnione drgawki na korzyść późniejszych lub ich braku. Nie było przypadku śmiertelnego, gdyż w tym modelu śmiertelność u zwierząt młodych jest znacznie obniżona, a właśnie one stanowiły użyty tutaj model młodocianych przypadków padaczki skroniowej.

Wbrew oczekiwaniom, w następstwie użycia MSO, moc sygnału EEG z kory mózgowej, wykazała jedynie statycznie nieistotną tendencję do obniżenia, ale istotne opóźnienie jej wzrostu było zbieżne z pojawieniem się, także opóźnionego, pierwszego uogólnionego zachowania drgawkowego. Oba te zjawiska były ze sobą istotnie skorelowane.

Zmianę całkowitej mocy sygnału EEG i jego poszczególnych pasm, po wywołaniu drgawek, wyrażano względem poziomu sprzed podania MSO i pilokarpiny. Moc każdego pasma zmieniała się, tak jak cały sygnał więc wykrycie ewentualnych różnic pomiędzy było trudniejsze. Gdyby jednak względną moc każdego z pasm wyrażono jako jego udział w całkowitej mocy sygnału, zmiany profilu rozkładu mocy w całościowym spektrum EEG mogłyby być bardziej subtelną charakterystyką funkcjonalną mózgu. Na przykład zmiana tak zdefiniowanej względnej mocy pasma theta, chociaż rejestrowana z powierzchni kory mózgowej, mogłaby pośrednio informować o aktywności formacji hipokampa. Warto także zastanowić się nad częstotliwościami przypisanymi poszczególnym pasmom EEG, gdyż u gryzoni nie muszą się one pokrywać ze standardami klinicznymi.

Elektrody do rejestracji EEG implantowano zwierzętom w wieku 19 dni. Wywołały one niewielkie uszkodzenia kory mózgowej. Znaczenie mógł tu mieć wzrost czaszki i mózgu w ciągu następnych pięciu dni przed wykonaniem EEG. Potrzeba uniknięcia tych zmian wydaje się usprawiedliwiać znaczne skrócenie okresu rekonwalescencji, który standardowo trwa około dwóch tygodni.

W związku z zaobserwowanymi relacjami, skupiono się na mechanizmach ich powstawania. Wykryto, że podanie MSO obniżyło aktywność GS, ale nie obniżyło jej ekspresji w formacji hipokampa. W okresie 150 minut od podania MSO nie było istotnych zmian, ale w ciągu następnych 15 minut aktywność GS uległa obniżeniu o około 50%, a po 60 minutach o prawie 84%. Zrozumienie tych zależności czasowych nie było łatwe. Brakowało mi graficznego schematu eksperymentu, który naszkicowałem na własny użytek i mam nadzieję, że bez istotnych błędów. W

dotadku w tekście rozprawy okresy czasu są podane w minutach po podaniu MSO, a na rycinie 1 oznaczone są symbolami upływu czasu po podaniu pilokarpiny. Nie wiadomo dokładnie których grup dotyczą zamieszczone tu symbole istotności statystycznej. Zwraca uwagę znaczne zróżnicowanie liczebności grup – od 3 do 23 zwierząt, które musiało mieć wpływ na wyniki analizy statystycznej.

W tym artykule przyjmuje się, że wywołanie opóźnienia napadów i tendencja do ich złagodzenia mają znaczenie neuroprotekcyjne. Nie jest to pewne, gdyż drgawki mogłyby zwiększyć swoje natężenie po upływie jednej godziny, a wtedy następcza neurodegeneracja mogłaby być nawet większa. Badania histologiczne zmian reaktywnych byłyby tu pomocne. Tak więc samo opóźnienie drgawek nie musi oznaczać złagodzenia sumarycznych efektów działania pilokarpiny w tym poziomie następczej neurodegeneracji.

Badania pozakomórkowego stężenia glutaminianu, w okresie od 30 minut przed do 60 minut po podaniu pilokarpiny, nie wykazały istotnego wpływu MSO, ale latencja jego wzrostu była zbieżna z zachowaniem drgawkowym i danymi z EEG i EMG.

Artykuł 2. Pawlik M, Aldana BI, Belfiori-Carrasco LF, Obara-Michlewska M, Popek M, Czarnecka AM, Albrecht J. 2021. 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. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(20):11127. doi: 10.3390/ijms222011127.

Tutaj znajdują się wyniki badań *in vivo* wpływu MSO na proces konwersji glutaminy w glutaminian podczas napadów drgawkowych, w tym samym modelu litowo-pilokarpinowym. Używając chromatografii gazowej i spektrometrii masowej nie wykryto istotnego wpływu MSO.

Wykonano dodatkowe badania *ex vivo*, na skrawkach z mózgow zwierząt, którym podano MSO. „Napady” wywoływano przez podniesienie poziomu potasu i rejestrowano zmiany wychwyty i wyrzutu znakowanego trytem D-asparaginianu, niemetabolizowanego odpowiednika glutaminianu. Wykryto statystycznie istotne osłabienie wyrzutu asparaginianu bez istotnej zmiany jego wychwyty.

Łącznie, wyniki te były podstawą konkluzji, że nieznanym mechanizmem opóźnienia i osłabienia napadów drgawkowych po podaniu MSO w eksperymencie opisanym w Artykule 1, nie jest związany ze zmniejszeniem syntezy glutaminy, a raczej z uwalnianiem glutaminianu z synaps.

Artykuł 3. Pawlik M, Miziak B, Walczak A, Konarzewska A, Chrościńska-Krawczyk M, Albrecht J, Czuczwar SJ. 2021. Selected molecular targets for anti-epileptogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 22:9737. doi: 10.3390/ijms22189737.

Autorzy tego artykułu zwracają uwagę na zjawisko krótkotrwałego wzrostu zawartości c-Fos mRNA i białka c-Fos w stymulowanych komórkach nerwowych, a także po napadach drgawkowych. Donoszą, że wykryli silną negatywną korelację pomiędzy czasem wystąpienia pierwszych behawioralnych, uogólnionych oznak drgawek po podaniu pilokarpiny a ekspresją c-Fos mRNA. Brak było istotnej korelacji ze zmianami natężenia drgawek. Ten fragment przeglądu sprawia wrażenie, że są to wyniki opisane w cytowanym Artykule 1, jednak pojawia się tam odsyłacz do ryciny 1. W opisie tej ryciny znajduje się jedyna skrócona informacja o stosowanej metodyce, bo w publikacji przeglądowej nie ma rozdziału o metodach. Informację o zezwoleniu komisji etycznej na te badania zawiera Institutional Review Board Statement. To dość niestandardowy opis badań. Szczegółowej informacji o tej metodyce, właściwej publikacjom naukowo-badawczym, nie ma też w części wstępnej Rozprawy. Czytelnik Artykułu 3 może mieć wrażenie, że rycina 1 pochodzi z cytowanego Artykułu 1, który jednak nie wspomina o c-Fos.

Artykuł 3 jest rozwiniętym, szczegółowym przeglądem mechanizmów molekularnych, które mogłyby być uwzględnione w farmakologicznej strategii zapobiegania epileptogenezie, a rozważania na temat c-Fos stanowią tylko jego ostatni, dwustronicowy fragment. Jest tam konkluzja: „*im dłużej zwierzę pozostaje odporne na działanie bodźca wywołującego drgawki, tym mniejsza będzie reakcja c-Fos. Innymi słowy, im dłużej zwierzę doświadcza drgawek, tym wyższa jest ekspresja c-Fos.*” (Artykuł 3, strona 9, koniec paragr. 2). Zdania te nie są jednak równoważne, gdyż wykryto tylko istotną ujemną korelację z latencją pierwszych uogólnionych objawów drgawkowych.

Używane są tutaj zamiennie symbole c-Fos mRNA i c-Fos, bez wskazania relacji pomiędzy procesami. Dlatego nie jest całkowicie pewne co zostało uznane za marker epileptogenezy. Badając tę zależność, trzeba pamiętać o tym, że chodzi tu o długotrwałe efekty bardzo krótkiego (około 15-30 minut) reaktywnego podwyższenia ekspresji c-Fos mRNA, a może znacznie dłuższego wzrostu (kilka godzin) ekspresji białka c-Fos, ale ta ostatnia nie była badana, na przykład immunohistochemicznie lub techniką Western Blot, możliwą do wykonania na tym samym materiale.

Został wyrażony wniosek, że uzyskane wyniki mocno przemawiają za statusem c-Fos, jako markera czasu trwania wczesnych drgawek „*early seizure duration-related marker*”, podczas gdy rzeczywiście ustalono, że był on ujemnie skorelowany z opóźnieniem pojawienia się pierwszych uogólnionych drgawek, bo pełny czas trwania drgawek, w ogóle nie mógł być badany, jako zależny od ich opóźnienia. Opóźnienie pierwszych drgawek powodowało bowiem skrócenie czasu, w którym te drgawki mogły być obserwowane przed zakończeniem eksperymentu, a więc automatyczne obniżenie ich oceny sumarycznej. Można więc było spodziewać się odwrotnej, a więc dodatniej korelacji sumarycznej oceny z poziomem ekspresji c-Fos mRNA, która nie była

efektem działania MSO. Taka tendencja wystąpiła, jednak była nieistotna, być może z braku uwzględnienia drgawek w ich pełnym wymiarze.

Tu zaznacza się następny problem. Jak wiadomo, wzrost ekspresji c-Fos mRNA zachodzi niezależnie od natury źródła aktywacji, która może być całkiem fizjologiczna, bez jakiegokolwiek dezintegracji zaangażowanego systemu neuronalnego. Czy zatem w takich normalnych warunkach można również rozważać c-Fos jako marker epileptogenezy?

W części wstępnej Rozprawy znajduje się sformułowanie (strona 28): „*powyższe obserwacje pozostawiają otwartą kwestię czy c-Fos powinien być rozważany tylko jako wczesny, biochemiczny marker epileptogenezy, czy także odgrywa on przyczynową rolę w ochronie przed napadami*”. Abstrakt Artykułu 3 nazywa c-Fos „*marker wczesnej epileptogenezy*”, a na stronie 9 jest to „*wczesny, odnoszący się do czasu trwania napadów, marker epileptogenezy*”, a po nim jest stwierdzenie, że „*jego aktywacja w początkowych stadiach epileptogenezy może być rozważana, jako reakcja neuroprotekcijna*”. Symbole c-Fos mRNA i c-Fos stosowane są zamiennie. Nie wiadomo co znaczą określenia drgawki „początkowe”, „wczesne” lub „wczesna epileptogeneza” w odniesieniu do pierwszych drgawek uogólnionych (4-5 w skali Racine'a), których czas wystąpienia był mierzony, a które nie zawsze były pierwszymi efektami działania pilokarpiny.

Konieczne trzeba wspomnieć o konkluzji IV umieszczonej na końcu części wprowadzającej (str. 31). Mówi ona, że poziom ekspresji c-Fos mRNA jest mocno negatywnie skorelowany z latencją uogólnionych drgawek oraz że MSO wykazuje tendencję do zmniejszania reakcji c-Fos na aktywność drgawkową. Jeśli jednak MSO wywołało wzrost latencji drgawek, to późniejsze, sumaryczne pobudzenie mózgu w zakresie godziny musiało być mniejsze. Nic więc dziwnego, że także c-Fos mRNA było mniej. Wydaje się, że jest tutaj daleko do związku przyczynowego między obecnością MSO a zmniejszeniem ekspresji c-Fos mRNA.

W całej rozprawie, a więc także w Artykule 3, brak wyraźnej informacji o relacji czasowej pomiędzy przebiegiem drgawek czy ich natężeniem a analizą PCR. Jest tylko minimalna, niejasna wzmianka w opisie ryciny 1. Ma to podstawowe znaczenie dla interpretacji wyników.

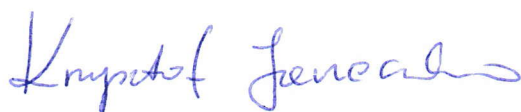
Jeśli badano skorelowanie wzrostu ekspresji c-Fos mRNA z zachowaniem drgawkowym, to pewnie można je było także odnieść do pozostałych, uprzednio zbadanych zjawisk istotnie skorelowanych z zachowaniem. Analizą statystyczną można wykryć lub zaprzeczyć istnieniu innych istotnych zależności, zwłaszcza pomiędzy stopniem ekspresji c-Fos a względną mocą sygnału EEG czy jego poszczególnych pasm. Oczywiście warunkiem, że dane pochodziły od tych samych zwierząt. Czy zrobiono coś takiego? Byłaby to podstawa osobnej, ważnej publikacji. Zamiast tego, wyniki badań reaktywnej ekspresji c-Fos mRNA, stały się tylko dodatkiem do dużego przeglądu, umieszczonym na samym jego końcu, w którym, w konkluzji poświęcono mu tylko ostatnie zdanie.

Histologiczna ocena poziomu neurodegeneracji, a zarazem ewentualnej neuroprotekcji byłaby cenna, ale bardzo ograniczona po jednogodzinnym czasie trwania eksperymentu. Należy też zapytać czy termin „hipokamp” oznacza w tej rozprawie całą formację hipokampa, czy tylko hipokamp właściwy, inaczej róg Amona. Części formacji hipokampa mają różny udział w aktywności drgawkowej mózgu i różnie na nią reagują.

Rozprawa doktorska mgr inż. Marka Pawlika dotyczy problematyki ogromnie ważnej dla rozwoju metod leczenia epilepsji. Została przygotowana starannie, bez poważniejszych uchybień edytorskich, a recenzowany cykl trzech artykułów został wielokrotnie poddany ocenie i przyjęty przez kompetentnych recenzentów wydawniczych. Wstępna część pracy jest napisana w sposób zwięzły, ze znajomością przedstawianego tematu. Również użyta w pracy literatura jest obszerna i zacytowana w sposób poprawny. Dyskusja obejmująca zarówno wnioski z literatury przedmiotu, jak i wyniki badań własnych Doktoranta, jest napisana w sposób zajmujący.

Wartość pracy naukowo-badawczej nie zależy jednak wyłącznie od uzyskania jednoznacznych wyników, możliwa jest także różna ich interpretacja, nawet kontrowersyjna. Wie o tym każdy, kto wiele lat poświęcił pracy badawczej. Znaczenie krytyczne dla rozwoju nauki ma często samo podjęcie działań poznawczych w nowych kierunkach i dokładniejsze poznanie dotychczas nieznanymi problemami praktycznymi i teoretycznymi. Teza ta jest o tyle ważniejsza i o tyle bardziej przekonująca, o ile badania prowadzone w zakresie rozprawy doktorskiej są często początkiem działalności, która w przyszłości wypełni życie młodego naukowca.

Przedstawiona do oceny rozprawa świadczy jednoznacznie o tym, że wyniki stanowiące jej podstawę zostały uzyskane bardzo dużym nakładem pracy. Doktorant dołożył starań, aby w zakresie stosowanych technik stworzyć wieloczynnikowy model przyczynowo-skutkowy. Wykazał samodzielność w rozwiązywaniu problemów badawczych i potrzebną do tego wiedzę, jak i przygotowanie praktyczne. Tym samym uczynił zadość kryteriom 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 65/2003, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego z przyjemnością przedkładam Radzie Naukowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, im. Profesora Mirosława Mossakowskiego wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Marka Pawlika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Krzysztof Janeczko