



UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE  
Wydział Farmaceutyczny  
Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką  
ul. Chodźki 4A (Collegium Pharmaceuticum), 20-093 Lublin  
tel. (081) 448 7250



-----

## Ocena pracy doktorskiej

**p.t. „Wpływ selektywnych ligandów receptora serotoninowego 5-HT<sub>6</sub> na aktywność**

**leków przeciwpsychotycznych u szczurów” wykonanej przez**

**mgr Joannę Rychtyk**

**na Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium Medicum w Krakowie**

**pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Wesołowskiej**

**promotor pomocniczy: dr. hab. Anna Partyka**

Serotonina (5-HT), amina biogenna i hormon tkankowy, jest także ważnym neuroprzekaźnikiem w ośrodkowym układzie nerwowym. Produkowana w komórkach enterochromatofilnych w błonie śluzowej jelit, jądrach szwu śródmózgowia, szyszynce i trombocytach pełni istotną rolę w regulacji procesów fizjologicznych i patologicznych, a zmiany funkcjonalne w szlaku serotoninergicznym mogą leżeć u podstaw etiologii wielu schorzeń, w tym chorób neurodegeneracyjnych, depresji i schizofrenii. 5-HT działa na receptory serotoninergiczne, obecnie znanych jest 7 ich podtypów, a wynik tego działania zależy od ich budowy i funkcji. Wśród tych receptorów, ważną, lecz nie od końca poznaną funkcję pełnią receptory 5-HT<sub>6</sub> zlokalizowane w prążkowie, jądrze półleżącym przegrody oraz w hipokampie, ciele migdałowatym, korze mózgowej, podwzgórzcu i wzgórzcu. Są one zlokalizowane głównie postsynaptycznie na neuronach GABAergicznym i glutaminianergicznym odgrywając znaczącą rolę w procesach plastyczności synaptycznej, tym samym w procesach pamięci i uczenia się. W kontekście schorzeń neuropsychiatrycznych, jak np. schizofrenia, wykazano, iż zarówno atypowe, jak i typowe neuroleptyki mogą blokować ten podtyp receptorów, co sugeruje, iż receptory 5-HT<sub>6</sub> mogą okazać się ważnym punktem uchwytu do poszukiwań leków potencjalnie skutecznych w leczeniu

schizofrenii z grupy ich antagonistów. Ciekawym jednak spostrzeżeniem jest to, iż w wielu aspektach i testach behawioralnych, zarówno agoniści, jak i antagoniści tych receptorów wykazują podobny profil i kierunek działania, np. efekty prokognitywne. Dość uboga literatura dotycząca tych tematów wymaga poszerzenia, a poznanie behawioralnych i ośrodkowych skutków podawania ligandów receptorów 5-HT<sub>6</sub> stanowi istotne zagadnienie i wyzwanie dla rozwoju nauk medycznych. Z uwagi na niewielką liczbę specyficznie działających ligandów, zarówno agonistów jak i antagonistów receptorów 5-HT<sub>6</sub> jako substancji narzędziowych, postęp wiedzy na temat funkcji tych receptorów w ośrodkowym układzie nerwowym jest znacznie utrudniony. Dalszy rozwój wiedzy o tych efektach nie może odbywać się z pominięciem danych uzyskanych w eksperymentach *in vivo* z użyciem zwierząt doświadczalnych.

Oceniana praca doktorska wpisuje się w ten nurt badań, posiadając ogromne walory poznawcze. Celem pracy było poszerzenie wiedzy na temat potencjalnych korzyści łącznego podania ligandów, selektywnego agonisty i antagonisty, receptorów 5-HT<sub>6</sub> i wybranych leków przeciwpsychotycznych (tj. haloperidolu, risperidonu i olanzapiny) u szczurów w aspekcie deficytów poznawczych oraz zaburzeń nastroju i lęku towarzyszących schizofrenii i jej farmakoterapii. Doktorantka zastosowała bardzo interesujące badania farmakologiczne *in vivo* w ogólnie akceptowanych testach behawioralnych do oceny efektów kognitywnych, jak test rozpoznawania nowego obiektu i test spontanicznej zmienności zachowania w labiryncie Y po podaniu w/w związków jednorazowo i wielokrotnie, pojedynczo i w kombinacjach. Jednocześnie, oceniła potencjalne ich działania przeciwdepresyjne w teście wymuszonego pływania oraz przeciwłękowe w teście podniesionego labiryntu krzyżowego oraz teście konfliktu wg Vogla oceniając także specyficzność tych działań. Dodatkowo, Doktorantka wykonała badania *ex vivo* celem oceny wpływu badanych związków i ich kombinacji na ekspresję genu i białka BDNF w hipokampie i korze przedczołowej z wykorzystaniem technik Western blot oraz Rt-qPCR. O wartości pracy doktorskiej świadczy fakt, że część wyników ocenianej rozprawy została już opublikowana, w

czasopismach impaktowanych, a prace badawcze opisane w rozprawie zrealizowano w całości w ramach grantu NCN Opus, którego kierownikiem była Pani Promotor, prof. dr hab. Anna Wesołowska.

Układ dysertacji doktorskiej jest typowy dla tego typu prac – bardzo obszerna rozprawa liczy 232 strony i zawiera wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, metodykę, wyniki, dyskusję, 41 przejrzystych i czytelnych rycin z wynikami badań oraz 38 tabel, spis rysunków i tabel, wykaz prawidłowo dobranego (nienumerowanego) piśmiennictwa, dobrze sformułowane konkretne, wypunktowane wnioski oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Wstęp (24 strony) stanowi przegląd literatury dotyczący ściśle tematyki rozprawy, czyli z jednej strony schizofrenii, jej symptomów i terapii, a z drugiej strony receptorów 5-HT<sub>6</sub>, działań ich ligandów oraz roli BDNF. Informacje zawarte we wstępie pracy są bardzo konkretne, związane ściśle z tematyką pracy. Autorka uniknęła tym samym zbytniego rozbudowania tej części dysertacji.

Cel pracy jest jasny, konkretny, sformułowany w punktach, uwzględniający badania *in vivo* i *ex vivo*, dobrze uzasadniony i sformułowany, z podaniem celów badawczych,

Rozdział „Metodyka” jest napisany bardzo dokładnie. Opis aparatury i procedur *in vivo* i *ex vivo* jest zrozumiały i wyczerpujący. Badania są zaplanowane bardzo starannie, a grupy eksperymentalne są odpowiednio kontrolowane. Zastosowano także adekwatne metody statystycznej oceny wyników. Umiejętność posługiwania się powyższymi technikami eksperymentalnymi świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Doktorantki w zakresie farmakologii doświadczalnej.

Rozmiar samej części doświadczalnej jest imponujący. Wyniki są przedstawione bardzo klarownie, zarówno jeśli chodzi o analizę statystyczną, jak i ich prezentację na rycinach. Jest to bardzo mocna część rozprawy, najobszerniejsza, zasługująca na specjalne wyróżnienie.

Dyskusja wyników jest logiczna i wyczerpująca. Doktorantka umiejętnie analizuje wyniki badań farmakologicznych i *ex vivo*, z podziałem na aktywność prokognitywną i przeciwdepresyjną

oraz przeciwlękową, charakteryzując użyte modele eksperymentalne, wykazując przy tym dużą znajomość obu aspektów tych zjawisk.

Rozprawę kończą wnioski prawidłowo sformułowane w punktach, uwzględniające obie części doświadczeń oraz wskazujące na wartość poznawczą pracy, oraz streszczenia. Za najważniejsze osiągnięcia naukowe Doktorantki uznać można wykazanie, iż: i) ligandy receptorów 5-HT<sub>6</sub> modyfikowały same i podane z wybranymi typowymi i atypowymi neuroleptykami (zwłaszcza olanzapiną i haloperidolem) deficyty poznawcze (pamięć poznawczą i socjalną) indukowane podanie MK-801, ze zwróceniem uwagi na wcześniej już obserwowany podobny kierunek i profil działania antagonisty i agonisty badanych receptorów; jednocześnie, nie zaobserwowano bezpośredniej korelacji między wpływem badanych ligandów (po podaniach wielokrotnych) i ich połączeń a poziomem BDNF i ekspresją jego genu w hipokampie i korze przedczołowej, co sugeruje, że ten szlak sygnalizacyjny związany z BDNF nie jest jedynym mechanizmem związanym z obserwowanymi efektami badanych substancji i ich połączeń; podobne efekty działania obu zastosowanych ligandów receptora 5-HT<sub>6</sub> mogą być skutkiem ich wpływu na alternatywne ścieżki sygnałowe sprzężone z tym typem receptorów; ii) co się tyczy aktywności przeciwlękowej i przeciwdepresyjnej, wykazano efekt przeciwdepresyjny agonisty 5-HT<sub>6</sub> po podaniu jednorazowym oraz osłabienia prodepresyjnego i anksjogennego działania haloperidolu; jednocześnie, nie wykazano wpływu badanych ligandów na zachowania depresyjne i lękowe po podaniu olanzapiny, podczas gdy zarówno agonista jak i antagonistą po podaniu wielokrotnym łącznie z risperidonem przyczyniły się do powstania efektu przeciwlękowego; wyniki sugerują, że korzystne anksjolityczne efekty łącznego podania ligandów receptorów 5-HT<sub>6</sub> z haloperidolem i risperidonem zależą od rodzaju reakcji lękowej mierzonej w danym teście; iii) uzyskane wyniki potwierdzają celowość poszukiwania nowych leków z grupy ligandów receptorów 5-HT<sub>6</sub> jako terapii uzupełniającej schizofrenii, często współistniejącej z zaburzeniami kognitywnymi i depresją/lękiem.

Sugerować można w tym miejscu, iż podobny kierunek działań agonisty i antagonisty receptorów 5-HT<sub>6</sub> wynikać może z ich wpływu na inną pulę receptorów postynaptycznych, zlokalizowanych na różnych typach neuronów, np. cholinergicznym i glutaminianergicznym (agonista) lub interneuronach GABAergicznym (antagonista, powodujący ich dezynhibicję).

Jeśli chodzi o stronę techniczną, edytorską i językową, to rozprawa jest bardzo starannie zredagowana, jej język bardzo poprawny, terminologia naukowa prawidłowa. Piśmiennictwo, odpowiednio dobrane i aktualne, zostało zacytowane właściwie.

W podsumowaniu chcę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca dotyczy bardzo ważnego, nie do końca poznanego, ale i trudnego tematu badawczego. Podjęte przez Panią mgr Joannę Rychtyk badania, precyzyjne sformułowanie ich celu, zakresu i sposobu przeprowadzenia doświadczeń uważam za przemyślane. Protokół badań *in vivo* i *ex vivo* zwraca uwagę starannością przygotowanego planu badawczego. Wysoko oceniam umiejętności warsztatowe Doktorantki, poszukiwania sposobów rozwiązywania problemów badawczych, korzystania z literatury stanowiącej przedmiot pracy oraz interpretacji wyników. Głównym argumentem przemawiającym za pozytywną oceną niniejszej pracy jest oryginalna konstrukcja przedstawionych badań, bazująca na obszernej wiedzy teoretycznej i warsztacie badawczym, właściwie wykorzystywanych przy konstrukcji kolejnych etapów pracy. Podjęty temat jest jednym z mniej poznanych, a wyniki niejednoznaczne, dość trudne do dyskusji lub oparte o porównania nieistotne statystycznie. W świetle przytoczonych przez Doktorantkę danych podjęty temat dysertacji jest wysoce uzasadniony i wnosi wiele nowych elementów o charakterze poznawczym, także z możliwością ich wykorzystania w klinice. Całokształt wyników ujętych w przedstawionej do oceny dysertacji jednoznacznie dowodzi, że badania nad zjawiskami i mechanizmami leżącymi u podstaw aktywności farmakologicznej ligandów receptorów 5-HT<sub>6</sub> i poszukiwania nowych leków z tej grupy, w farmakoterapii schizofrenii i depresji celem zwiększenia bezpieczeństwa farmakoterapii, są niezwykle istotne i nadal wymagają wzbogacenia, także przy użyciu testów behawioralnych.

Podsumowując, rozprawę doktorską pani **mgr Joanny Rychtyk p.t.** „Wpływ selektywnych ligandów receptora serotoninowego 5-HT<sub>6</sub> na aktywność leków przeciwpsychotycznych u szczurów”, wykonaną na Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium Medicum w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Wesołowskiej i promotora pomocniczego: dr. hab. Anny Partyki oceniam bardzo wysoko. Rozprawa spełnia ustawowe warunki o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnioskuje do wysokiej Rady Dyscypliny Nauki farmaceutyczne UJ w Krakowie o dopuszczenie pani **mgr Joanny Rychtyk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Do niniejszej recenzji składam jednocześnie wniosek o wyróżnienie rozprawy z uzasadnieniem.



Lublin, 21.07.2021