dr hab. Katarzyna Socała, prof. UMCS
Katedra Fizjologii Zwierząt i Farmakologii
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Akademicka 19, 20-033 Lublin

tel. +48 81 537 50 84, fax: +48 81 537 59 01
e-mail: katarzyna.socala@mail.umcs.pl

OCENA

pracy doktorskiej mgr Moniki Głuch-Lutwin pt. „Charakterystyka selektywności funkcjonalnej nowych agonistów receptora serotoninowego typu 5-HT_{1A}”

Depresja, na którą według Światowej Organizacji Zdrowia cierpi obecnie ok. 350 milionów osób na całym świecie, jest poważnym zaburzeniem psychicznym, prowadzącym do upośledzenia funkcjonowania chorego i pogorszenia jakości życia, a w najcięższych przypadkach do samobójstwa. Systematyczny wzrost zachorowań, obciążający charakter oraz wysokie koszty ekonomiczne dla systemu służby zdrowia sprawiają, że depresja stanowi istotny problem socjoekonomiczny. Depresja jest chorobą o złożonej i wieloczynnikowej etiologii, a jej patomechanizm nie jest do końca znany. Choć na rynku farmaceutycznym dostępne są liczne leki przeciwdepresyjne, o różnych mechanizmach działania, to szacuje się, że ok. 30% pacjentów nie odpowiada na leczenie. Kolejnymi problemami związanym z farmakoterapią depresji są częste działania niepożądane i opóźniony efekt terapeutyczny. Konieczne jest zatem poszukiwanie nowych, bardziej skutecznych leków przeciwdepresyjnych oraz nowych ścieżek sygnalizacyjnych, których modulacja farmakologiczna może przynosić efekt terapeutyczny, nie wywołując równocześnie efektów niepożądanych.

Receptor serotoninowy typu 5-HT_{1A} odgrywa istotną rolę w różnych procesach fizjologicznych i patologicznych. Receptor ten reguluje wiele ścieżek transdukcji sygnałów, wpływa na ekspresję białek istotnych w depresji (np. BDNF), bierze udział w regulacji plastyczności neuronów oraz wpływa na poziom glutaminianu i wydaje się, że odpowiednia modulacja tego receptora może stworzyć nowe możliwości terapeutyczne dla osób chorujących na depresję. Niestety większość dostępnych obecnie ligandów receptora 5-HT_{1A} nie wykazuje selektywności wobec receptorów umiejscowionych pre- i postynaptycznie, a także pożądanej w terapii ścieżki sygnalizacyjnej. Z tego względu niezwykle istotne jest poszukiwanie nowych związków oddziaływujących na receptor 5-HT_{1A}, o wysokim powinowactwie i selektywności receptorowej oraz odpowiednim profilu funkcjonalnym.

W związku z powyższym postawiony w rozprawie doktorskiej mgr Moniki Głuch-Lutwin cel pracy, obejmujący charakterystykę funkcjonalną modelowych i nowych agonistów

receptora 5-HT_{1A} oraz ocenę działania przeciwdepresyjnego wybranych związków o różnej selektywności funkcjonalnej uważam za w pełni uzasadniony. Poruszony temat badawczy dotyczy ważnego i niezwykle interesującego zagadnienia, jakim jest zjawisko selektywności funkcjonalnej w procesie poszukiwania nowych leków. Wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy mają duże znaczenie nie tylko poznawcze, ale również aplikacyjne, gdyż mogą przyczynić się do opracowania związków, które staną się wartościowymi narzędziami farmakologicznymi w badaniach nad funkcją receptora 5-HT_{1A}, a w dalszej perspektywie do opracowania nowych form farmakoterapii depresji lub innych chorób.

Przedstawiona do oceny praca liczy (wraz z złącznikami) 181 stron i ma typowy dla prac eksperymentalnych układ edytorski. Obejmuje kolejno: *Spis treści, Streszczenie, Wstęp, Założenia i cel pracy, Wyniki, Dyskusję, Wykaz najważniejszych skrótów, Spis tabel, Spis rycin, Bibliografię i Załączniki*.

Pracę rozpoczyna 32-stronicowy *Wstęp*, który poprzedzony został krótkim (2 strony) *Streszczeniem* wprowadzającym czytelnika w tematykę pracy i najważniejsze uzyskane wyniki. W pierwszym podrozdziale *Wstępu* Doktorantka w zwięzły sposób przedstawiła charakterystykę zaburzeń depresyjnych (podstawowe objawy, epidemiologię, sposoby leczenia) oraz omówiła najważniejsze hipotezy na temat patomechanizmu depresji. Kolejne podrozdziały *Wstępu* poświęcone zostały charakterystyce receptora 5-HT_{1A} ze szczególnym uwzględnieniem jego roli w zaburzeniach afektywnych. Opisane zostały szczegółowo poszczególne ścieżki transdukcji sygnału po pobudzeniu receptora 5-HT_{1A}, zjawisko selektywności funkcjonalnej jako podstawa nowych możliwości w poszukiwaniu nowych leków oraz selektywność funkcjonalna agonistów receptora 5-HT_{1A}, co doskonale wyjaśnia zasadność podjętych badań i koresponduje z celem pracy, a także świadczy o znakomitym przygotowaniu teoretycznym Autorki. Warto również zwrócić uwagę na umieszczone we *Wstępie* ryciny, które dopełniają omawiane treści merytoryczne.

Założenia i cel pracy (3 strony) przedstawione zostały w przejrzysty sposób. Celem pierwszej części badań była poszerzona charakterystyka selektywności funkcjonalnej związków wzorcowych (serotoniny, buspironu, 8-OH-DPAT, 5-karboksyamidotryptaminy i aripiprazolu), związków modelowych (F15599, F13714 i befiradolu) oraz 54 innowacyjnych związków. Druga część doświadczeń miała na celu ocenę potencjału przeciwdepresyjnego 4 wybranych stronniczych agonistów receptora 5-HT_{1A}, w tym trzech ww. związków modelowych oraz nowego związku o symbolu NLX-204, który w badaniach *in vitro* wykazywał selektywność funkcjonalną wobec fosforylacji ERK1/2 oraz odznaczał się bardzo korzystanymi właściwościami lekopodobnymi.

Kolejny rozdział, obejmujący 23 strony, poświęcony został charakterystyce części doświadczalnej. Szczegółowo opisano w nim użyte materiały i zastosowane metody badawcze. Eksperymenty zostały rzetelnie zaplanowane i przeprowadzone z wykorzystaniem różnych metod i technik badawczych. W badaniach *in vitro* wykorzystano 2 ciągłe linie komórkowe (CHO-K1 h5-HT_{1A} i U2OS h5-HT_{1A}), a badania *in vivo* zostały przeprowadzone z wykorzystaniem myszy szczepu CD-1. Warunki prowadzenia doświadczeń na zwierzętach

spełniają aktualnie obowiązujące standardy uzyskując akceptację II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie. Dobór materiałów i metod oraz sposób analizy uzyskanych danych nie budzą żadnych zastrzeżeń.

Otrzymane wyniki zaprezentowano na 52 stronach, w sposób bardzo szczegółowy i przejrzysty, z wykorzystaniem starannie opracowanych 24 rycin i 19 tabel. Część wyników umieszczono również w załączniku. Opisane zostały analizy funkcjonalne związków referencyjnych i modelowych oraz 54 nowych ligandów receptora 5-HT_{1A} wobec czterech ścieżek przekazywania sygnału (fosforylacji ERK1/2, hamowania aktywności cyklazy adenylanowej, rekrutacji β-arestyny i mobilizacji jonów wapnia). Badane związki charakteryzowały się zróżnicowanym współczynnikiem preferencji wobec różnych ścieżek przekazywania sygnału, ale w większości preferowały one aktywację szlaku kinaz białkowych MAP, co ma istotne znaczenie dla działania przeciwdepresyjnego. Warto również wspomnieć, że po raz pierwszy udało się zidentyfikować wśród ligandów receptora 5-HT_{1A} związki o wyraźniej preferencji wobec rekrutacji β-arestyny. W badaniach *in vivo* związki modelowe (F15599, F13714 i befiradol) oraz innowacyjny związek NLX-204 wykazywały działanie przeciwdepresyjne w teście wymuszonego pływania. W modelu chronicznego nieprzewidywanego łagodnego stresu jednorazowe podanie F15599, F13714 i befiradolu znosiło wydłużony czas trwania bezruchu w teście wymuszonego pływania, ale nie łagodziło zachowania podobnego do anhedonii, ocenianego w teście preferencji sacharozy. W modelu depresji indukowanej kortykosteronem F15599, befiradol i NLX-204 skracały czas trwania bezruchu w teście wymuszonego pływania. Dodatkowo befiradol i NLX-204 zwiększały spożycie sacharozy. Wszystkie 4 badane związki zwiększały poziom pERK1/2 w korze przedczołowej zwierząt poddanych procedurze chronicznego nieprzewidywanego łagodnego stresu. W hipokampie efektu takiego nie zaobserwowano jedynie w przypadku befiradolu. Podanie F15599, F13714 i NLX-204 (ale nie befiradolu) zwiększało również poziom pERK1/2 w hipokampie myszy, które otrzymywały kortykosteron. Żaden z podanych związków nie wpływał na poziom pCREB w obydwu modelach depresji.

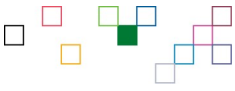
Ostatni rozdział pracy stanowi *Dyskusja*, obejmująca 18 stron, w której Doktorantka omówiła i zinterpretowała otrzymane wyniki, skonfrontowała je z aktualnymi danymi literaturowymi i wysunęła odpowiednie wnioski, co świadczy o dobrej znajomości literatury przedmiotu i podjętego problemu badawczego.

Bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej mgr Moniki Głuch-Lutwin. Założone cele zostały w pełni zrealizowane, a otrzymane wyniki są interesujące, nowatorskie i skłaniają do dalszych badań nad selektywnymi funkcjonalnie agonistami receptora 5-HT_{1A}, które mogą znaleźć zastosowanie w opracowywaniu nowych form leczenia zaburzeń nastroju i innych chorób. Warto zwrócić uwagę na fakt, że Doktorantka musiała opanować szeroki wachlarz metod oraz umiejętność współpracy z innymi zespołami badawczymi. Pracę oceniam jak najbardziej pozytywnie. Podczas jej lektury nasunęło mi się jedynie kilka drobnych uwag, które przedstawiam poniżej.

1) W opisie badań *in vivo* warto byłoby podać całkowitą liczbę zwierząt wykorzystanych do przeprowadzenia doświadczeń oraz numer zgody LKE na wykonanie doświadczenia.
2) Zabrakło wyjaśnienia, na jakiej podstawie dobrano sposób dawkowania i drogę podania badanych związków.
3) Z opisu na str. 64 wynika, że zwierzęta otrzymywały badane związki przez 4 tygodnie trwania procedury nieprzewidywalnego chronicznego łagodnego stresu, podczas gdy w pozostałych częściach pracy podawana jest informacja, że zwierzęta otrzymały testowane związki jednorazowo.
4) W rozdziale opisującym wykorzystywane testy behawioralne zabrakło opisu testu preferencji sacharozy. Test ten nie został również ujęty na Rycinach 7 i 8 przedstawiających schematy doświadczeń.
5) Nie podano typu i nazwy producenta aparatu do pomiaru aktywności ruchowej zwierząt.
6) Zabrakło informacji, czy stosowana była randomizacja i czy eksperymenty wykonywane były metodą ślepej próby, co jest szczególne ważne w badaniach behawioralnych.
7) Choć o wnioskach wynikających z przeprowadzonych doświadczeń można dowiedzieć się z rozdziału *Dyskusja*, to warto byłoby jednak umieścić na końcu pracy najważniejsze wnioski w postaci kilku punktów.
8) Praca napisana jest poprawnym i zrozumiałym językiem, zawiera jednak bardzo liczne błędy interpunkcyjne.
9) Niektóre skróty stosowane są w tekście niekonsekwentnie. Rozwinięcie skrótu należy podawać przy pierwszym pojawieniu się go w tekście, następnie konsekwentnie stosować już tylko skrót, co nie miało miejsca w przypadku np. cAMP, PKA, LTP, PI3K, SSRI.
10) Bibliografia liczy 225 pozycji, ale kilka pozycji jest zduplikowanych, np. Berg et al. 1998, Dwivedi et al. 2001, Liu et al. 2017 i Zhao et al. 2008. Ponadto praca Autry et al. 2011 i Autry et al. 2012 to w rzeczywistości ta sama praca, a pozycja Chen et al. 2013 zawiera wyłącznie autorów i datę publikacji, brakuje pozostałych danych.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Moniki Głuch-Lutwin pt. „Charakterystyka selektywności funkcjonalnej nowych agonistów receptora serotoninowego typu 5-HT_{1A}" stanowi ważny wkład w badania nad nowymi selektywnymi funkcjonalnie ligandami receptora 5-HT_{1A}. Wszystkie wymienione przez mnie uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości naukowej ocenianej rozprawy. Prezentowana praca wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki umiejętność planowania i przeprowadzania złożonych eksperymentów zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, analizy otrzymanych wyników i ich interpretacji. Rozprawa ta spełnia wszelkie

wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Moniki Głuch-Lutwin do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na oryginalność poruszonej tematyki badawczej i wysoką wartość naukową niniejszej rozprawy wnioskuję również o jej wyróżnienie.

Lublin, 20 września 2022 r.