UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ
Zakład Chemii Leków
15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2D
Tel. (85) 748-57-06, FAX (85) 748-58-66
arkadiusz.surazynski@umb.edu.pl

Dr hab. n. farm. Arkadiusz Surażyński

Białystok, 07.10.2022.

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

pt. „Charakterystyka selektywności funkcjonalnej nowych agonistów receptora serotoninowego typu 5-HT$_{1A}$" wykonanej przez mgr Monikę Głuch-Lutwin na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Marcina Kołaczkowskiego oraz promotora pomocniczego dr hab. Karoliny Pytki, Prof. UJ .

Recenzja została przygotowana na zlecenie Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, w oparciu o art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 (z poźn. zm.), dotyczący wymagań stawianych rozprawom doktorskim.

Mgr Monika Głuch-Lutwin przedstawiła rozprawę doktorską w formie monografii o wskazanym tytule, co jest zgodne z wymaganiami ustawowymi dotyczącymi formy rozprawy doktorskiej (art. 187 pkt. 3). Rozprawa doktorska ma klasyczny układ, zawierający rozdziały umożliwiające pełne zrozumienie postawionej tezy oraz ocenę jej realizacji i osiągnięte wyniki wraz z ich interpretacją. Zasadnicza, merytoryczna część rozprawy wzbogacona jest spisem treści, wykazem skrótów, spisem tabel i rycin oraz załącznikami stanowiącymi materiały dodatkowe, co ułatwia analizę i interpretację wyników badań.

Treść niniejszej pracy doktorskiej wpisuje się w problematykę naukowo-badawczą realizowaną na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, dotyczącą roli receptorów serotoninowych w procesach fizjologicznych i patologicznych zachodzących w organizmie człowieka. Przedmiotem badań objętych rozprawą doktorską jest charakterystyka selektywności funkcjonalnej agonistów receptora serotoninowego typu 5-HT$_{1A}$ stosowanych w terapii chorób układu nerwowego, opisanych zarówno w literaturze oraz nowo zsyntetyzowanych związków. Zakres zrealizowanych zadań badawczych obejmował badania *in vitro*, *in vivo*, jak i *ex vivo* wybranych agonistów receptorów serotoninowych.

We wstępie, Doktorantka przedstawiła bardzo szeroko i wyczerpująco tło naukowe rozprawy. Poruszane zagadnienia są bardzo wnikliwie opisane i stanowią doskonałe wprowadzenie do badań

stanowiących *novum* w części eksperymentalnej pracy. Doktorantka w swojej pracy dokonała przeglądu literatury z zakresu dotychczasowej wiedzy na badany temat oraz wykorzystała doświadczenie zespołu naukowców Wydziału Farmaceutycznego UJCM, o ugruntowanym autorytecie badawczym w tej dziedzinie. Szeroko został omówiony problem zaburzeń afektywnych, ze szczególnym uwzględnieniem depresji, również w kontekście współczesnej farmakoterapii. Doktorantka wnikliwie opisuje patomechanizmy zaburzeń depresyjnych oraz poznawczych, podkreślając udział poszczególnych genów, neuroprzekaźników, enzymów oraz receptorów w tych procesach. Jednakże szczególną uwagę kieruje na udział receptora 5-HT_{1A} w zaburzeniach afektywnych i podkreśla zależność efektów terapii oraz towarzyszących im działań niepożądanych, od aktywacji poszczególnych szlaków sygnałowych indukowanych przez ten receptor. Doktorantka szczegółowo opisuje ścieżki transdukcji sygnału aktywowane przez receptor 5-HT_{1A} oraz wynikające z tego konsekwencje metaboliczne oraz potencjalnie terapeutyczne. Omówienie zjawiska selektywności funkcjonalnej agonistów receptora 5-HT_{1A} jako możliwości poszukiwania skuteczniejszych i bezpieczniejszych leków, poparte jest licznymi przykładami związków opisanych w literaturze. Jakkolwiek ten obszar badawczy stanowi przedmiot licznych badań i jest intensywnie eksplorowany, to jednak poszukiwanie aktywnych ligandów receptorów serotoninowych o różnej selektywności funkcjonalnej, wykazujących preferencje sygnalizacyjne, może być szczególnie interesujące ze względu na działanie terapeutyczne oraz potencjalne efekty niepożądane. Świadczy to jednoznacznie o wysokiej ogólnej wiedzy teoretycznej w omawianej dyscyplinie naukowej, a co za tym idzie, daje jednoznaczne podstawy do spełnienia wymogu zawartego w art. 187 pkt 1 Ustawy.

Doktorantka sformułowała cel i założenia pracy, dzieląc je na trzy główne etapy: 1) optymalizacja i walidacja metody badania wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału od pobudzonego receptora 5-HT_{1A} z wykorzystaniem związków wzorcowych na modelu komórkowym ze stabilną nadekspresją badanego receptora, poszerzoną charakterystykę funkcjonalną wybranych związków modelowych wobec charakterystycznych dla tego receptora, dotąd nie opisanych ścieżek sygnałowych oraz na podstawie uzyskanych wyników, pełną charakterystykę funkcjonalną 54 nowo otrzymanych syntetycznych agonistów receptora 5-HT_{1A} w celu selekcji związków z większą selektywnością funkcjonalną niż związki referencyjne 2) badania *in vivo* z wykorzystaniem myszy CD-1, zarówno naiwnych jak i w dwóch modelach depresji, w celu zbadania potencjalnego działania przeciwdepresyjnego związków różniących się selektywnością funkcjonalną włączając związki modelowe oraz wybraną, nową, innowacyjną pochodną. Dodatkowo Doktorantka zbadała wpływ tych związków na funkcje kognitywne, co jest niezwykle istotne przy tego typu związkach. 3) wykonanie oznaczeń *ex vivo* kluczowych białek (fosforylowanej formy kinazy ERK1/2 oraz białka CREB) w hipokampie i korze przedczołowej badanych zwierząt. Dodatkowo, bezpieczeństwo badanych związków przetestowała na liniach komórkowych HepG2. Zrozumienie poszczególnych etapów badań i ich założeń bardzo ułatwia umieszczony w tym rozdziale schemat opisujący harmonogram badań. Uważam, że cel pracy został sformułowany prawidłowo, jasno sprecyzowany, obejmujący kompleksowe badania *in vitro*, *in vivo* oraz *ex vivo* zarówno w aspekcie oceny funkcjonalnej związków wzorcowych, jak i innowacyjnych pochodnych. Czytelne

sformułowanie celu pracy, jego prawidłowa realizacja oraz szeroki zakres zastosowanych badań są bardzo pozytywną stroną przedstawionej pracy.

Na uznanie zasługuje szeroki zakres zastosowanych metod i technik badawczych. Do realizacji celu badawczego Doktorantka użyła nowoczesnych, zaawansowanych technik biologii molekularnej, oraz badań *in vivo*, wykorzystując do badań m.in. modele komórkowe w tym 2 z nadekspresją receptora 5-HT_{1A} a także zwierzęta doświadczalne. W badaniach na modelach komórkowych posłużyła się nowoczesnymi technikami badawczymi w tym ultraczułą metodą TR-FRET do oceny poziomu cAMP, technologią Alpha Lisa do oceny ilościowego poziomu fosforylowanej formy kinazy ERK1/2, metody Aequo Screen do oceny wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia, którą potwierdziła również metodą FLUO-4 AM, technikami fluorescencji badanie rekrutacji β-arestyny oraz aktywacji kanałów GIRK. Zastosowane techniki badawcze charakteryzują się wysoką wiarygodnością wyników, umożliwiają identyfikację molekularnych zmian oraz pozwalają na opis mechanizmów biochemicznych w procesach zachodzących w komórkach pod wpływem badanych czynników. Metody badawcze służące tym celom zostały prawidłowo dobrane i poddane weryfikacji. Badania *in vivo* zostały przeprowadzone na myszach, samcach rasy Swiss Albino, szczepu CD-1 zgodnie z dyrektywami UE, zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną. Doktorantka oceniła wpływ badanych związków na zwierzęta w badaniach behawioralnych: teście wymuszonego pływania oraz aktywności lokomotorycznej, do oceny działania przeciwdepresyjnego wykorzystała model nieprzewidywalnego łagodnego stresu oraz depresji indukowanej kortykosteronem, natomiast badania kognitywne oceniła w teście rozpoznawania nowego obiektu. Dopełnieniem wyników były badania *ex vivo* w celu oceny kluczowych elementów funkcjonalności badanych substancji – oznaczenie poziomu pCREB oraz pERK ½ w wybranych obszarach mózgu zwierząt poddanych testom metodą ELISA. Na uznanie zasługuje nie tylko bardzo szeroki wachlarz technik badawczych, szczegółowy i zrozumiały ich opis, ale przede wszystkim ich prawidłowy dobór w kontekście łączenia metod *in vitro*, *in vivo* i *ex vivo*. Potwierdza to, że mgr Monika Głuch-Lutwin legitymuje się nie tylko szeroką wiedzą teoretyczną, ale również imponująco bogatym warsztatem naukowym.

Przedstawione wyniki badań własnych zostały opisane szczegółowo, rzetelnie i w logicznym układzie, z zastosowaniem licznych, szczegółowo i bogato opisanych rycin oraz tabel, co znacznie ułatwia interpretację uzyskanych wyników i w znaczący sposób uwiarygadnia prezentowane badania. Następująca po nich dyskusja jest przeprowadzona klarownie i bardzo sprawnie. Doktorantka opisując w niej wyniki i wyciągnięte na ich podstawie wnioski, konfrontuje je z aktualną literaturą nadając im szeroki kontekst naukowy. Pozwala to pozytywnie ocenić specjalistyczną wiedzę mgr Moniki Głuch-Lutwin, umiejętność rozwiązywania problemów badawczych, korzystania z literatury stanowiącej przedmiot pracy oraz interpretacji wyników i wyciągania logicznych wniosków.

Na podstawie wyników obszernych badań, Doktorantka formułuje szereg precyzyjnych wniosków. Odzwierciedlają one najistotniejsze elementy poznawcze pracy i w pełni odpowiadają na założenia i cele pracy.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć:

Wskazanie zależności struktura – aktywność, zarówno w związkach referencyjnych jak również w związkach innowacyjnych, które pozwalają na modyfikacje chemiczne związków, w celu otrzymania pożądanych profili funkcjonalnych. Przykładem mogą być badania nad referencyjnym związkiem F15599 oraz związkiem innowacyjnym NLX-204, których struktura szczególnie predysponuje do aktywacji postsynaptycznego receptora 5-HT_{1A} i aktywacji ścieżki sygnałowej związanej z pERK ½. Natomiast związek referencyjny F13714 oraz innowacyjny NLX-249, dzięki elementom strukturalnym, wykazywały się wysokimi preferencjami wobec rekrutacji β-arestyny. Oba te zjawiska mają niezwykle istotne znaczenie w leczeniu depresji. W związku z tym niosą zarówno potencjał terapeutyczny, jak i mogą stanowić cenny model farmakologiczny w badaniach nad rolą receptorów 5-HT_{1A} w zaburzeniach neuropsychiatrycznych. Poznanie elementów strukturalnych cząsteczek substancji referencyjnych oraz innowacyjnych wywołujących określone zmiany funkcjonalne w receptorze 5-HT_{1A} daje wskazówki do dalszych prac nad projektowaniem związków w aspekcie wybranej selektywności funkcjonalnej.

Wyniki uzyskane metodami *in vitro* znalazły odzwierciedlenie w badaniach *in vivo*. Testy wybranych przez Doktorantkę związków modelowych oraz innowacyjnego NLX-204 na myszach naiwnych wykazały potencjalne działanie antydepresyjne, a dodatkowo brak wpływu na aktywność lokomotoryczną oraz procesy poznawcze. Omawiane związki referencyjne oraz innowacyjny związek NLX-204, dały również bardzo korzystne efekty terapeutyczne w dwóch mysich modelach depresji. Również badania *ex vivo* potwierdziły różnorodny wpływ badanych związków na ekspresję fosforylowanych form kinazy ERK1/2 w korze przedczołowej oraz hiopkampie co z jednej strony potwierdza niedobory tej kinazy w przebiegu depresji w badanych rejonach mózgu, a z drugiej, sugeruje, że selektywna stymulacja funkcjonalna receptora serotoninowego 5-HT_{1A} odpowiednim agonistą może odwrócić deficyty pERK ½w hipokampie oraz korze przedczołowej i stanowić potencjalny kierunk leczenia zaburzeń depresyjnych.

Opisane osiągnięcia, mają charakter nowatorski, jasno formułują problem badawczy oraz sugerują nowatorskie rozwiązanie problemu naukowego z wykorzystaniem nowoczesnego, kompleksowego warsztatu badawczego, wypełniając tym samym wymagania stawiane pracom doktorskim, określone w art. 187 pkt 2 Ustawy, natomiast gruntowna wiedza teoretyczna połączona z umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy badawczej wypełnia całkowicie wymagania art. 187 pkt 1.

Wysokiej wartości merytorycznej rozprawy towarzyszy wysoka jakość w zakresie edytorskim. Z obowiązku recenzenta zwrócę jedynie uwagę, że Autorka nie ustrzegła się drobnych uchybień w pracy i tak np. w rozdziale „część eksperymentalna" nie dostrzegłem opisu metodologii do oceny wpływu badanych związków na preferencję spożycia roztworu sacharozy u myszy, w rozdziale „Bibliografia" Autorce przydarzyły się powtórzenia tej samej literatury, a w samym tekście niniejszej dysertacji napotkałem na nieliczne błędy językowe czy literowe. Wskazane uchybienia w żadnym stopniu nie zaburzają uwagi czytelnika podczas lektury i nie umniejszają wartości pracy.

Niemniej jednak niektóre wyniki i zagadnienia zamieszczone w rozprawie doktorskiej mogą stanowić przedmiot dalszej dyskusji, na przykład:

1) Z literatury wiadomo, że różne obszary mózgu mają zróżnicowaną ekspresję i rozmieszczenie receptorów serotoninowych. Z drugiej strony badania wykazały, że zwiększona gęstość oraz aktywność autoreceptorów 5-HT_{1A} predysponuje do występowania depresji. Nasuwa się więc pytanie, czy podczas przeprowadzania eksperymentów na samych komórkach lub hodowlach komórkowych, szczególnie z nadekspresją tego receptora, Doktorantka zauważyła zależność odpowiedzi komórkowej lub zmianę ścieżki sygnałowej od receptora 5-HT_{1A} od ilości zastosowanych komórek lub stopnia ich konfluencji?
2) Czy różnice składu medium hodowlanego, np. różnice w zawartości glutaminy, NEAA, kwasu pirogronowego w pożywce pozostawały bez wpływu na badane procesy?
3) Podczas badania ekspresji pERK ½ komórki były inkubowane na płytkach 96-dołkowych w odpowiedniej ilości, następnie poddane działaniom związków. Czy po okresie inkubacji przeprowadzono standaryzację ilości komórek, które następnie poddano analizie?
4) Czy wyselekcjonowane innowacyjne związki (NLX-249 oraz NLX-204) przebadano *in vitro* w obecności selektywnego antagonisty receptora 5-HT_{1A} w celu wykluczenia innych mechanizmów działania tych związków?
5) Czy inne związki które, niezależnie od receptora 5-HT_{1A} podwyższają ekspresję pERK ½ w neuronach mózgu, mogą być użyte pomocniczo w terapii depresji?
6) Czy istnieje możliwość stworzenia wirtualnego modelu receptora serotoninowego 5-HT_{1A}, w którym potencjalni selektywni, funkcjonalni agoniści poprzez charakterystyczne ugrupowania, inicjowałyby poszczególne ścieżki sygnałowe, tym samym wywołując określone efekty metaboliczne w komórce nerwowej. Byłby to doskonały model dydaktyczny wyjaśniający zależność działania od struktury na przykładzie agonisty receptora serotoninowego.

Powyższe pytania nie mają charakteru uwag i nie umniejszają merytorycznych wartości pracy doktorskiej, natomiast mogą stanowić element dyskusji nad funkcjonalnym znaczeniem opisanych odkryć.

Reasumując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Głuch-Lutwin stanowi oryginalny i twórczy wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych, będąc ważnym uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy oraz inspirację do dalszych badań w poruszanym temacie. Jak wcześniej wskazałem spełnia ona wszystkie wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.).

Warto również zaznaczyć, że praca ta powstała na podstawie realizacji grantu OPUS we współpracy z firmą Neurolixis finansowanego przez NCN, a znaczna część wyników pracy została już opublikowana w renomowanym, międzynarodowym czasopiśmie *Psychopharmacology*. Dodatkowo Doktorantka posiada imponujący dorobek naukowy, wg bazy PubMed jest współautorką 52 publikacji oryginalnych, Jej prace na dzień 07.10.2022 były cytowane ponad 582

razy, a indeks Hirscha wynosi 14. Wszystkie te informacje świadczą nie tylko o wypełnieniu wymogów ustawowych, ale o posiadaniu predyspozycji do dalszego rozwoju naukowego.

Upoważnia mnie to do wystąpienia z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie o dopuszczenie mgr Moniki Głuch-Lutwin do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie niniejszej rozprawy, którego uzasadnienie dołączam w oddzielnym dokumencie.

07.10.2022

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Leków
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
dr hab. Arkadiusz Surażyński