

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Renaty Pukło pt. "Znaczenie receptorów glutaminianergicznych NMDA w regulacji cytochromu P450 w wątrobie" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Władysławy Anny Daniel w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk.

Obwodowe mechanizmy regulujące aktywność izoenzymów cytochromu P450 pozostają nie w pełni poznane. Szczególnie słabo zbadanym obszarem jest wpływ funkcji ośrodkowego układu nerwowego (OUN) na metaboliczną aktywność tkanek obwodowych. Dotychczas wykazano, że modulacja stężenia hormonów syntetyzowanych w OUN może oddziaływać na aktywność enzymatyczną w narządach obwodowych. Badania prowadzone przez zespół pod kierunkiem prof. Władysławy Anny Daniel wskazują na istotną rolę ośrodkowych układów noradrenergicznego, dopaminergicznego i serotonergicznego w regulacji aktywności izoenzymów cytochromu P450 w wątrobie. Aktualnie realizowany przez Doktorantkę projekt stanowi kontynuację wieloletnich zainteresowań badawczych tego zespołu. Dane literaturowe sugerują ponadto, że ośrodkowy układ glutaminianergiczny może modulować obwodowe stężenia hormonów, które z kolei wpływają na aktywność enzymów wątrobowych. Wykazano również, że obwodowe podanie substancji modulujących ośrodkowy układ glutaminianergiczny wpływa na aktywność cytochromu P450 w wątrobie.

W świetle przedstawionych przesłanek w pełni uzasadnione jest podjęcie przez Doktorantkę badań mających na celu określenie wpływu modulacji ośrodkowego układu glutaminianergicznego na aktywność wybranych izoenzymów cytochromu P450 w tkankach obwodowych, w szczególności w wątrobie. Ustalenie zmian aktywności enzymatycznej wywołanych zmiennym oddziaływaniem układu glutaminianergicznego może przyczynić się do lepszego zrozumienia uwarunkowań farmakokinetyki leków u pacjentów przyjmujących substancje modulujące ten układ. Tematyka pracy doktorskiej jest nowoczesna i wpisuje się w aktualny nurt badań prowadzonych w ośrodkach naukowych na całym świecie.

W oparciu o powyższe przesłanki Doktorantka podjęła się określenia wpływu związku CP-101,606 (będącego selektywnym antagonistą podjednostki GluN2B receptora NMDA) na centralną neuroendokrynną regulację cytochromu P450 w wątrobie, w szczególności identyfikację struktur mózgowych i hormonów pośredniczących w tym procesie. Szczegółowe cele badania obejmowały ocenę, po wielokrotnym obustronnym podaniu CP-101,606 do komór bocznych mózgu szczura lub wielokrotnym podaniu CP-101,606, obustronnie do jąder przykomorowych (PVN) lub jąder łukowatych (ARC): 1.

aktywności enzymów cytochromu P450 (CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP3A) w mikrosomalnej frakcji wątroby po zastosowaniu różnych dróg podania domózgowego związku CP-101,606; 2. poziomu białka oraz mRNA wybranych enzymów cytochromu P450, dla których obserwowano zmiany w aktywności enzymatycznej; 3. stężenia hormonów w surowicy krwi (hormon wzrostu, kortykosteron, trójiodotyronina, tyroksyna) oraz w przysadce mózgowej oraz w jądrach podwzgórza (GHRH, somatostatyna); 4. wpływ CP-101,606 na aktywność wybranych enzymów cytochromu P450 w szczurzych mikrosomach wątrobowych. O jakości zamierzeń badawczych oraz aktualności podjętej tematyki świadczy również fakt przyznania funduszy zewnętrznych na realizację niektórych zadań badawczych przez Narodowe Centrum Nauki (NCN – OPUS 12 (kierownik: prof. dr hab. Władysława Anna Daniel, „Rola systemu glutaminianergicznego mózgu w neuroendokrynej regulacji ekspresji i aktywności cytochromu P450 w wątrobie” (nr 2016/23/B/NZ7/02283). Realizacja powyższych zadań badawczych umożliwiła publikację uzyskanych wyników w czasopismach umieszczonych na liście JCI: Pukło R, Bromek E, Haduch A, Basińska-Ziobroń A, Kuban W, Daniel WA. Molecular Mechanisms of the Regulation of Liver Cytochrome P450 by Brain NMDA Receptors and via the Neuroendocrine Pathway-A Significance for New Psychotropic Therapies. *Int J Mol Sci.* 2023; 24:16840 (IF=4,9) oraz Pukło R, Bromek E, Basińska-Ziobroń A, Haduch A, Kuban W, Danek PJ, Daniel WA. The neuroendocrine regulation of hepatic cytochrome P450 by N-methyl-D-aspartate receptors in the paraventricular and arcuate nuclei of the hypothalamus. *Drug Metab Dispos* 2025; 53:100143 (IF=4,0).

We wstępie, stanowiącym doskonale wprowadzenie do pracy doktorskiej, Doktorantka przedstawiła współczesne poglądy dotyczące izoenzymów cytochromu P450 w wątrobie i ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), łącznie ze znanymi mechanizmami regulacyjnymi. Kolejna część wstępu została poświęcona opisowi układu glutaminianergicznego w OUN i obwodzie oraz jego potencjalnej roli w patofizjologii zaburzeń neuropsychiatrycznych. Poszczególne podrozdziały Wstępu stanowią znakomite opracowania i z całą pewnością po dalszym dopracowaniu mogłyby zostać opublikowane jako prace poglądowe.

Dla zrealizowania postawionych celów Autorka przeprowadziła szereg badań na szczurach, samcach szczepu Wistar Han, u których modulowano aktywność układu glutaminianergicznego poprzez wielokrotne podanie CP-101,606 (selektywny antagonistą podjednostki GluN2B receptora NMDA) do komórek bocznych mózgu szczura lub obustronnie do jąder przykomorowych (PVN) lub jąder łukowatych (ARC) przy użyciu pompy do mikroiniekcji. W następnym etapie oceniano wpływ ww. procedur modulujących aktywność układu glutaminianergicznego na aktywność enzymów CYP w mikrosomach wątrobowych przy zastosowaniu swoistych substratów (1'-hydroksybufuralolu - CYP2D; 2 α - i 16 α -hydroksytestosteronu - CYP2C11; 2 β - i 6 β -hydroksytestosteronu - CYP3A; 7 α -hydroksytestosteronu - CYP2A; 16 β -

hydroksyttestosteronu - CYP2B; 7-hydroksywarfaryny - CYP2C6; kwasu 1,3,7-trimetylomoczwowego, paraksantyny, teobrominy - CYP1A) i detekcji za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczowego z detekcją fluorymetryczną lub UV, jak również oznaczono poziom białka enzymów cytochromu P450 (CYP1A, 2B, 2C6, 2C11, 2D, 3A, CYP2A) stosując technikę Western blotting (przy zastosowaniu komercyjnych przeciwciał i zestawów) oraz ekspresję genów wybranych genów CYP w wątrobie techniką RT-PCR (stosując komercyjnie dostępną mieszaninę reakcyjną TaqMan Gene Expression MasterMix oraz sondy TaqMan Gene expression assay; *ACTB* jako gen referencyjny). Ponadto dokonano pomiaru stężenia wybranych hormonów (somatostatyna, hormon uwalniający hormon wzrostu, hormon wzrostu, kortykosteron, trójjodotyronina, tyroksyna) w surowicy krwi oraz w przysadce mózgowej i w obszarach podwzgórza zawierających PVN lub ARC przy użyciu komercyjnych zestawów ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) wg metodyki producenta. Należy stwierdzić, że sposób zaplanowania badań oraz ich przeprowadzenie świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do realizacji założonych celów badania. Wynikają one również z długotrwałej pracy w obszarze prowadzonych badań promotą, prof. Władysławy Anny Daniel, która jest uznanym ekspertem w dziedzinie oddziaływania ośrodkowego układu nerwowego na metabolizm leków w tkankach obwodowych. Metodyka badania jest bardzo nowoczesna, plan badań dobrze skonstruowany. W zadaniach badawczych być może należałoby uwzględnić również zastosowanie blokerów badanych hormonów w celu jednoznacznego wykazania ich wpływu na zmiany ekspresji/aktywności nadanych enzymów, np. pegwisomantu dla hormonu wzrostu, flutamidu dla testosteronu, inhibitorów peroksydazy tarczycowej itp. Do dyskusji pozostaje zastosowanie ketaminy jako środka znieczulenia, ze względu na jej wpływ na układ glutaminianergiczny.

Doktorantka wykazała m.in., że pięciodniowe podawanie CP-101,606 do komórek bocznych mózgu szczura (w dawkach 6, 15 lub 30 $\mu\text{g}/\text{mózg}$) wywierało zależny od dawki wpływ na aktywność enzymów cytochromu P450 w wątrobie oraz na profil hormonalny podwzgórza i przysadki. Najniższa dawka antagonisty powodowała zwiększenie aktywności, poziomu białka oraz ekspresji mRNA izoformy CYP2C11 w porównaniu z grupą kontrolną. Aktywność enzymów CYP2A, CYP2B, CYP2C11, CYP2C6 i CYP2D, a także poziomy białka CYP2B i CYP2C11 były wyższe po zastosowaniu najniższej dawki niż po dawce najwyższej. Ponadto CP-101,606 zwiększał zawartość białka CYP1A oraz ekspresję *CYP1A1* i *CYP1A2*, nie wpływając jednak na aktywność enzymatyczną tych izoform. Preparat obniżał także stężenie somatostatyny w przysadce oraz zwiększał poziom hormonu wzrostu (GH) w surowicy po podaniu najniższej dawki, a jednocześnie – niezależnie od dawki – zmniejszał stężenie kortykosteronu w surowicy. Podawanie CP-101,606 przez pięć dni bezpośrednio do jądra przykomorowego podwzgórza zwiększało poziom somatostatyny zarówno w tym jądrze, jak i w przysadce mózgowej, obniżało stężenie GH oraz kortykosteronu w surowicy, a jednocześnie podwyższało poziom trójjodotyroniny (T_3). Zaobserwowano

również obniżenie ekspresji (na poziomie mRNA i białka) oraz aktywności izoenzymów CYP1A1/2, CYP2A1/2, CYP2B1/2, CYP2C11 i CYP3A w wątrobie. Z kolei wielokrotne podawanie CP-101,606 do jądra łukowatego podwzgórza prowadziło do zmniejszenia poziomu hormonu uwalniającego hormon wzrostu (GHRH) w jądrze łukowatym i w przysadce, a także do obniżenia stężeń GH i kortykosteronu w surowicy, bez istotnych zmian w zakresie hormonów tarczycy. Stwierdzono ponadto redukcję ekspresji i aktywności wątrobowych enzymów CYP1A1/2 oraz CYP2C11, jak również obniżenie ekspresji CYP3A2.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła dziesięć wniosków: 1. Wyniki uzyskane po 5-dniowych podawaniach związku CP-101,606, selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA, do komórek bocznych mózgu szczura wywołały efekty odwrotne aniżeli po podaniach obwodowych (wzrost i spadek), co mogło wynikać z odmiennej dystrybucji badanego związku w mózgu po tych dwóch różnych drogach podania i/lub udział mechanizmów obwodowych po podaniu dootrzewnowym; 2. Różnice obserwowane po podaniu różnych dawek związku CP-101,606 do komórek bocznych mózgu szczura mogły być z kolei pochodną odmiennej dystrybucji związku w obrębie narządów okołokomorowych, związanej z położeniem anatomicznym jąder podwzgórza zaangażowanych w regulację sekrecji hormonów przysadkowych oraz aspektem farmakokinetycznym. Wydaje się, iż związek CP-101,606 mógł silniej oddziaływać na jądro przykomorowe, które wydziela somatostatynę, aniżeli na jądro łukowate uwalniające GHRH; 3. Pięciodniowe podawanie związku CP-101,606 do jąder przykomorowych lub łukowatych podwzgórza wywołało szereg zmian w ekspresji i aktywności wątrobowych enzymów CYP (spadek) oraz w poziomie hormonów. Kierunek tych zmian był zgodny z efektami obserwowanymi po 5-dniowym podawaniu antagonisty drogą dootrzewnową; 4. Mechanizm centralnej regulacji neuroendokrynnej, za pośrednictwem którego badany antagonist NMDA może wpływać na obniżenie ekspresji i aktywności wątrobowych enzymów CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C11 i CYP3A przebiega poprzez stymulację wydzielania somatostatyny oraz zahamowanie wydzielania GHRH z podwzgórza, regulujących kolejno negatywnie i pozytywnie wydzielanie hormonu wzrostu z przysadki mózgowej, jak również poprzez stymulację osi podwzgórze–przysadka–tarczyca, i zahamowanie osi podwzgórze–przysadka–nadnercza; 5. Kierunek działania antagonisty receptora NMDA podanego lokalnie do jąder przykomorowych lub łukowatych podwzgórza na wątrobowy cytochrom P450 był podobny, co wskazuje, iż w przypadku obwodowych podań CP-101,606 wypadkowy efekt oddziaływania związku na enzym poprzez wymienione jądra podwzgórza powinien ulegać wzmocnieniu, w przeciwieństwie do opisanych w literaturze naukowej układów monoaminergicznych, które wykazywały przeciwstawną rolę jąder przykomorowych i łukowatych podwzgórza w neuroendokrynnej regulacji cytochromu P450; 6. Badania *in vitro* z użyciem szczurzych mikrosomów wątrobowych wykazały, iż związek CP-101,606 nie wpływa bezpośrednio na regulowane hormonalnie enzymy CYP2A, CYP2B, CYP2C11 oraz CYP3A; 7. Związek CP-101,606 nie wpływał na enzymy

CYP2C6 i CYP2D, które nie są podatne na regulację hormonalną. Można zatem przypuszczać, że szybkość metabolizmu tego związku (ulegającego biotransformacji przez CYP2D) nie ulegnie zmianie podczas wielokrotnego podawania; 8. Wyniki badań otrzymane w niniejszej pracy wskazują, że wpływ obwodowego podania związku CP-101,606 na wątrobowy cytochrom P450 pochodzi głównie z oddziaływania związku na poziomie układu nerwowego mózgu; 9. Receptory NMDA zawierające podjednostkę GluN2B, obecne w jądrach przykomorowych i łukowatych podwzgórza, mają istotne znaczenie w mechanizmach regulacyjnych cytochromu P450 przez układ glutaminianergiczny. 10. Obserwowane zmiany w ekspresji i aktywności enzymów cytochromu P450 pod wpływem blokady receptora NMDA (przez nowe leki) mogą mieć znaczenie medyczne, zarówno dla metabolizmu substancji endogennych (np. sterydów), jak i biotransformacji jednocześnie podawanych innych leków, co może prowadzić do interakcji farmakokinetycznych. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski dobrze oddają uzyskane wyniki, wynikają bezpośrednio z analizy wyników uzyskanych w czasie realizacji badań. Niektóre spośród nich są jednakże raczej przytoczeniem wyników i powinny mieć bardziej uogólniony charakter.

Dyskusja przeprowadzona przez Autorkę jest prowadzona bardzo dojrzałe. Doktorantka umiejętnie odniosła własne wyniki do dostępnych danych literaturowych. Sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza bardzo dobre przygotowanie metodyczne i szeroką wiedzę dotyczącą tematyki prowadzonych badań. W dyskusji Autorka wskazuje, że ośrodkowa modulacja układu glutaminianergicznego prowadzi do zmian stężenia hormonów, które to z kolei wpływają na aktywność cytochromu P450 wątrobie. Być może należałoby również stwierdzić, że zastosowanie blokerów receptorów dla hormonów umożliwiłoby na bezpośrednie powiązanie wpływu poszczególnych hormonów na obwodową indukcję/zahamowanie aktywności badanych enzymów w wątrobie (powyższy wpływ może być przecież mediowany innymi dotychczas nie znanymi czynnikami uwalnianymi z OUN pod wpływem modulacji układu glutaminianergicznego).

Praca jest napisana w sposób przejrzysty, ma układ typowy dla tego typu rozpraw obejmuje wstęp, hipotezę badawczą/cel pracy, materiał i metody, wyniki badań oraz dyskusję wyników, wnioski i wykaz piśmiennictwa oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawa doktorska obejmuje 147 stron. Piśmiennictwo w liczbie 238 pozycji zamieszczono we właściwy sposób. Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci adekwatnie opracowanych tabel i rycin ułatwiających zapoznanie się z wynikami pracy. Przejrzystości pracy dodaje umiejętne podzielenie poszczególnych części na podrozdziały co bardzo ułatwia zapoznanie się z rozprawą i jej ocenę. Należy jednakże zwrócić uwagę na błędne oznaczenie zastosowanego testu – powinno być t-test Studenta, a nie test t-Studenta; tytuł podrozdziału „9. Oznaczenie poziomu mRNA wybranych genów CYP w wątrobie techniką RT-PCR” powinien raczej brzmieć „9. Oznaczenie ekspresji wybranych genów CYP w wątrobie techniką RT-PCR”. Powyższe uwagi nie obniżają jednakże

wysokiej oceny pracy.

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autorki, która bardzo dobrze opanowała niełatwy warsztat badawczy i wykazała bardzo dobre merytoryczne przygotowanie. Uważam, że praca stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2024, poz. 1571 z późn. zm. Fakt opublikowania wyników w renomowanych czasopismach świadczy o aktualności podjętej tematyki badawczej i nowoczesnej metodyce badań, jak również o umiejętności Doktorantki (będącej pierwszym autorem wszystkich publikacji) prowadzenia dyskusji z recenzentami w podczas ostatecznej redakcji artykułów. Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN o dopuszczenie mgr inż. Renaty Pukło do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Jednocześnie ze względu na dużą wartość poznawczą wyników oraz opublikowanie ich w renomowanych czasopismach: *International Journal of Molecular Sciences* (IF=4,9) oraz *Drug Metabolism and Disposition* (IF=4,0) (Doktorantka we wszystkich racach jest pierwszym autorem) wnioskuję o wyróżnienie pracy „*Summa cum laude*”.

Prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik