



## **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Renaty Pukło pt.:**  
**”Znaczenie receptorów glutaminianergicznym NMDA w regulacji**  
**cytochromu P450 w wątrobie”**  
**wykonanej**  
**w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk**  
**pod kierunkiem prof. dr hab. Władysławy Anny Daniel**

Podawanie leków pacjentom jest generalnie sytuacją, w której lek wprowadzony do ustroju człowieka ze środowiska zewnętrznego jako ksenobiotyk winien zostać z niego wydalony. Procesy, które biorą udział w przygotowaniu leku do jego wydalania są nazywane metabolizmem leku lub ich biotransformacją. Jak wiadomo, metabolizm leków przebiega z udziałem różnych reakcji biochemicznych pod wpływem układów enzymatycznych i jest ważnym czynnikiem wpływającym na ostateczny efekt farmakodynamiczny. Głównym jednak celem procesu biotransformacji jest przygotowanie leków do ich wydalania z organizmu np. przekształcenia lipofilnych, niepolarnych związków w łatwo rozpuszczalne w wodzie (hydrofilne metabolity), które mogą być wydalone z moczem. Przemiany, jakim ulegają ksenobiotyki dzieli się na dwie fazy. W fazie I znakomita większość leków jest metabolizowana przez enzymy cytochromu P-450 (CYP), zwłaszcza z udziałem rodzin CYP1–3. Znajomość aktywności tych enzymów jest szczególnie ważna z farmakogenetycznego punktu widzenia. Wśród wielu z nich bowiem zauważono występowanie tzw. odmian polimorficznych np. dla CYP2D6. Jest to obecnie jedną z przyczyn konieczności wdrażania tzw. indywidualizacji farmakoterapii. Jednak wśród czynników, które są odpowiedzialne za modyfikację metabolizmu leków są jednak nie tylko te związane z farmakogenetyką, ale także takie jak wiek pacjenta, dawka podawanego leku oraz interakcje zachodzące podczas metabolizmu (np. występowanie tzw. induktorów i inhibitorów metabolizmu leków). Poznanie więc mechanizmów regulacyjnych, które wpływają na wydajność procesu biotransformacji, zwłaszcza w wątrobie, jest ważne z klinicznego punktu widzenia.

Wiadomo, że klasycznie podwzgórze ma zdolność wpływania na aktywność wątroby poprzez anatomicznie trzy ważne obszary, które wysyłają nerwowe sygnały autonomiczne do narządów obwodowych: jądro brzuszno-przyśrodkowe podwzgórza (VMH) w obszarze przyśrodkowym, obszar boczny podwzgórza (LHA) oraz jądro okołokomorowe podwzgórza (PVN) w obszarze okołokomorowym, gdzie jądro VMH wysyła sygnały współczulne do wątroby za pośrednictwem zwojów trzewnych, LHA wysyła sygnały przywspółczulne do wątroby za pośrednictwem nerwu błędnego, a PVN integruje informacje z innych obszarów podwzgórza i wysyła oba sygnały autonomiczne do wątroby (Uyama N. et al Neural connections between the hypothalamus and the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004; 280(1): 808-820). Obecnie jednak wiadomo, że regulacja wydajności biotransformacji może zachodzić za pośrednictwem niektórych hormonów kontrolowanych przez aktywność podwzgórza. Prace bowiem zespołów badawczych, m.in. pod kierunkiem promotora ocenianej dysertacji, prof. dr hab. Władysławy Daniel, dostarczyły dowodów, że regulacja podwzgórza poprzez takie systemy neuroprzekąznikowe jak układ noradrenergiczny, dopaminergiczny czy serotonergiczny i wpływania na czynność przysadki oraz uwalniane przez nią hormony może również zmieniać aktywność reakcji enzymatycznych związanych z CYP450.

Na tym tle podjęcie przez Autorkę niniejszej rozprawy badań nad określeniem udziału przekąźnictwa glutaminianergicznego i receptorów NMDA obecnych w mózgu w neuroendokrynnej regulacji wątrobowego cytochromu P450 w warunkach modelowych **było ciekawe, stanowiąc novum o możliwych implikacjach klinicznych.**

Przedłożona do recenzji rozprawa mgr inż. Renaty Pukło, która powstała w trakcie realizacji studiów doktoranckich w Krakowskiej Interdyscyplinarnej Szkole Doktorskiej, posiada formę monografii, a układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych. Należy pokreślić, że znakomita większość rezultatów tych badań została opublikowana w 2 artykułach, **w których Doktorantka jest pierwszym autorem** (Pukło R. et al. 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, Pukło R. et al. 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). Materiał recenzowanej pracy doktorskiej Autorka zamieściła w 10 rozdziałach na 144 stronach numerowanych. Po objaśnieniu użytych skrótów (str. 5-7) w rozdziale pierwszym (str. 9-36) przedstawiono wstęp, w którym opisano cytochrom P450, jego budowę i funkcje (Tabela 1) wraz z różnicami występującymi pomiędzy człowiekiem i szczurem (Tabela 2) oraz fizjologiczną regulację zachodzącą pod wpływem tego układu w wątrobie oraz mózgu. Podano także współczesne poglądy oddziaływania układu neuroendokrynego na

funkcjonowanie cytochromu P450 (Ryc. 1), a także zamieszczono informacje na temat układu glutaminianergicznego, jego roli w neuroprzekaznictwie tak w mózgu (Ryc. 2, 3), jak i na obwodzie oraz udziału tego układu w patofizjologii schorzeń neuropsychiatrycznych. W kolejnym rozdziale przedstawiono cel pracy (str. 37-41), generalnie tożsamy z tematem recenzowanej pracy, który dotyczył zbadania wpływu związku CP-101,606 (znanego też pod nazwą – traxoprodil) jako selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA na centralną neuroendokrynną regulację cytochromu P450 w wątrobie, a w szczególności identyfikację struktur mózgowych i hormonów pośredniczących w tym procesie. W rozdziale tym przedstawiono także cele szczegółowe do których należało dawko-zależne wielokrotne obustronne podania wybranego związku do komór bocznych mózgu szczura, obustronne podanie do jąder podwzgórza mózgu: jąder przykomorowych (PVN) lub jąder łukowatych (ARC) i następnie ocena aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 wraz z analizą ich ekspresji na poziomie mRNA oraz białka w mikrosomalnej frakcji wątroby szczurów. Ponadto postanowiono zmierzyć w takich warunkach doświadczenia stężenia hormonu wzrostu, kortykosteronu, trójiodotyroniny i tyroksyny we krwi zwierząt oraz takich hormonów jak somatoliberyna i somatostatyna w przysadce mózgowej oraz w jądrach podwzgórza. Dodatkowo w celach porównawczych zaplanowano zbadanie bezpośredniego wpływu związku CP-101,606 na aktywność wybranych enzymów cytochromu P450 w szczurzych mikrosomach wątrobowych. W rozdziale tym zamieszczono również schemat badań ułatwiający śledzenie realizacji założeń recenzowanej dysertacji (Ryc. 5). W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Materiały i Metody” (str. 42-58) szczegółowo omówiono metodykę badań wraz ze stosowanymi metodami, które znalazły zastosowanie w przeprowadzonych eksperymentach m.in. podawanie domózgowe związku CP-101,606 szczurom, przygotowanie materiału biologicznego, badanie aktywności wybranych enzymów cytochromu P450 z wykorzystaniem specyficznych substratów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz oznaczenie: 1) poziomu białka wybranych enzymów cytochromu P450 w mikrosomach wątroby techniką Western blotting, 2) poziomu mRNA wybranych genów CYP w wątrobie techniką RT-PCR, 3) poziomu wybranych hormonów przy pomocy zestawów ELISA. Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń umieszczono na 29 rycinach (Ryc. 6-39) i zamieszczając je wraz z ich szczegółową analizą popartą wnioskowaniem statystycznym w rozdziale zatytułowanym „Wyniki” (str. 59-93). Otrzymane dane dogłębnie przedyskutowano w rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” (str. 94-107), w którym dodatkowo zestawiono otrzymane dane w dwóch tabelach (Tabela 4, 5) dla ułatwienia wnioskowania wraz z zaproponowanym przez Autorkę dysertacji schematem mechanizmu wpływu blokady

podjednostki GluN2B receptora NMDA na neuroendokrynną regulację wątrobowego cytochromu P450 u szczura (Ryc. 36). Spis cytowanych prac (str. 116-143) obejmuje 238 pozycji piśmiennictwa opublikowanych w latach 1960 – 2025 (wraz z klasyczną publikacją Karl Joachim Netter'a z 1960 r. dotyczącą pozyskiwania mikrosomów czy pracą z 1962 r. poświęconą opisowi cytochromu P450 przez Tsuneo Omurę i Ryo Sato), w tym 91 pozycji w ostatnich 10 latach (tj. 2015-2025), głównie pochodzących z czasopism specjalistycznych oraz 1 monografię, które ściśle są związane z tematyką przedstawianą tak we wstępie, jak i umiejętnie wykorzystywane w dyskusji.

Na podstawie otrzymanych wyników Autorka **sformułowała 10 wniosków** (str. 108-109), z których pierwszych 7 ma charakter wniosków bezpośrednio odnoszących się do otrzymanych wyników stwierdzając m.in., iż „Wyniki uzyskane po 5-dniowych podawaniach związku CP-101,606, selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA, do komór bocznych mózgu szczura wywołały efekty odwrotne aniżeli po podaniach obwodowych (wzrost i spadek)(...)”, „Różnice obserwowane po podaniu różnych dawek związku CP-101,606 do komór bocznych mózgu szczura mogły być z kolei pochodną odmiennej dystrybucji związku w obrębie narządów okołokomorowych (...)”, „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(..), „Mechanizm centralnej regulacji neuroendokrynniej, za pośrednictwem którego badany antagonistą 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, (...), „Kierunek działania antagonisty receptora NMDA podanego lokalnie do jąder przykomorowych lub łukowatych podwzgórza na wątrobowy cytochrom P450 był podobny, (...), „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” oraz „Związek CP-101,606 nie wpływał na enzymy CYP2C6 i CYP2D, które nie są podatne na regulację hormonalną”. Natomiast wnioski 8-9 mają charakter raczej konkluzji podsumowującej, a wniosek 10 jest raczej pewną sugestią dotyczącą ewentualnego medycznego wykorzystania otrzymanych *wyników*

W pracy zamieszczono również streszczenie w języku polskim (str. 110-112) i angielskim (str. 113-115), natomiast nie zawarto zarówno spisu rycin jak i tabel.

Przedstawiona do oceny praca ma charakter odpowiadający wymogom rozpraw doktorskich bazujących na badaniach eksperymentalnych w postaci monografii, prowadzonych w szerokim zakresie i precyzyjnie udokumentowanych. Dysertacja ta wyróżnia się nie tylko **dobrze opracowanym, opartym na aktualnym, światowym piśmiennictwie wstępie**, ale także dokonaniem **właściwego doboru metod do przeprowadzenia badań** zakreślonych w celu pracy wraz z wyznaczonymi celami szczegółowymi.

Chciałbym pokreślić, że podjęty przez Autorkę temat wpisuje się z coraz częściej podkreślany **ważny dialog metaboliczny wzdłuż osi „wątroba–mózg”** wskazując, że jest on dwukierunkowy, choć trzeba przyznać, iż droga aferentna ((komunikacja „wątroba–mózg”), niż droga eferentna (komunikacja „mózg–wątroba” - będąca przedmiotem dysertacji) jest bardziej znana i częściej bywa przedmiotem badań, co zapewne jest związane z występowaniem znanych schorzeń np. encefalopatii wątrobowej (Yang X. et al. Metabolic Crosstalk between Liver and Brain: From Diseases to Mechanisms. Int J Mol Sci. 2024; 25(14): 7621).

Generalnie przedstawiona dysertacja spełnia kryteria właściwego sposobu rozwiązywania problemu naukowego, **a więc postawienia hipotezy** o istnieniu zależności między układem glutaminianergicznym w mózgu a jego oddziaływaniem na procesy peryferyjne, w tym przypadku metabolizm zachodzący przez układ wybranych izoenzymów cytochromu P450 w wątrobie, **i sposobu jej zweryfikowania jest właściwa**. Wybrane bowiem narzędzia, a więc użycie właściwego antagonisty receptora związanego z badanym układem neuroprzekąźnikowym, odpowiedni sposób podawania substancji do słusznie wybranych części mózgu (podanie do komórek bocznych mózgu, podanie do jąder przykomorowych (PVN) lub łukowatych (ARC)), wynikający ze znajomości możliwości działania glutaminianu na receptory NMDA w podwzgórzu, połączone z pomiarem związanych z aktywnością podwzgórza i przysadki takich hormonów jak somatolibertyna, somatostatyna i uwalnianych do krwi hormonu wzrostu, kortykosteronu, trójiodotyroniny (T3), czy tyroksyny (T4) wraz z zastosowaniem właściwych metod oceniania aktywności wybranych izoenzymów cytochromu P450 oraz ich ekspresji na poziomie mRNA i białka wraz z interesującą, wynikającą z posiadanej wiedzy dyskusją i umiejętnością wyciągania odpowiednich wniosków na podstawie otrzymanych danych **stanowi dowód na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez mgr inż. Renatę Pukło**.

Chciałbym w tym miejscu podkreślić, że wykonanie wszystkich badań było związane z wykonaniem przeszło 3000 oznaczeń jednostkowych, stąd ich organizacja, wykonanie oraz analiza na pewno stanowiło duże wyzwanie dla Autorki recenzowanej dysertacji, z czym sobie doskonale wg mojej opinii poradziła.

**Udział** wkładu Doktorantki w powstanie dysertacji **jest bardzo wysoki i dominujący**, bowiem porównując dane zamieszczone w recenzowanej monografii należy stwierdzić, że są one praktycznie tożsame z danymi zawartymi w dwóch (wspomnianych już wcześniej) publikacjach z roku 2023 i 2025, w których mgr. inż. Renata Pukło jest pierwszym autorem.

Otrzymane wyniki wraz z przedstawionymi wnioskami przez Autorkę wskazują, że **istnieje wpływ układu glutaminianergicznego na regulację cytochromu P450 w wątrobie, tym samym realizując założony cel pracy, co stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego przez mgr inż. Renatę Pukło.**

Mimo bardzo dobrej, miejscami doskonałej treści jak i formy tej pracy, nie uniknięto też pewnych, acz nielicznych, nieścisłości bądź uchybień.

Po pierwsze - nie do końca wiadomo, dlaczego wybrano taki a nie inny układ doświadczenia, innymi słowy, dlaczego podawano wybrany związek 5-krotnie i skąd się wzięły takie (tj. 6, 15 i 30 µg) a nie inne dawki tego związku. Rozumiem, że zapewne oparto się na schematach poprzednich badań nad wpływem innych układów neuroprzekaźnikowych na aktywność enzymów cytochromu P450 w wątrobie, sądzę jednak, iż ten fakt winien być jednoznacznie wspomniany.

Po drugie - opis otrzymanych wyników, w których wartości po podaniu stosowanego związku nie różniły się statystycznie znamienne do wartości kontrolnych nie powinien obejmować dalszych rozważań, np. o efekcie jego podawania w poszczególnych dawkach (np. Ryc. 8 – wpływ CP-101,606 na aktywność CYP2A mierzonej na podstawie szybkości 7 $\alpha$ -hydroksylacji testosteronu; Ryc. 9 - wpływ CP CP-101,606 na poziom białka aktywność CYP2B; Ryc. 10 – wpływ CP-101,606 na aktywność enzymu CYP2C6 mierzonej szybkością 7-hydroksylacji warfaryny; Ryc. 12 - wpływ CP-101,606 na aktywność enzymu CYP2D; Ryc. 14 - wpływ CP-101,606 na poziom somatostatyny czy trójiodotyroniny).

Do pewnej nieścisłości można też zaliczyć przytaczane informacje we wstępie o wpływie zmienności międzyosobniczej obserwowanej w przypadku izoenzymu CYP3A4 z wynikającej z istnienia czynników genetycznych i pozagenetycznych, a wpływających na ryzyko działań niepożądanych „zwłaszcza w przypadku leków o wąskim oknie terapeutycznym, jak na przykład leki przeciwnowotworowe” (str. 12). Nie negując występowania wąskiego indeksu leków przeciwnowotworowych, chciałbym jednak wspomnieć, że obecnie z uwagi na wielość grup farmakologicznych do których zaliczamy leki stosowane w leczeniu chorób nowotworowych i wielu różnic występujących pomiędzy nimi jeśli chodzi o ich profil farmakologiczny, użyte przez Autorkę sformułowanie jest bardzo ogólnikowe i niesie niewiele za sobą treści.

Chciałbym także wspomnieć, iż nazywanie użytego przez Autorkę związku modelowego CP-101,606 lekiem (str. 39) jest pewnym nadużyciem, bowiem wydaje się, że jak dotąd związek ten nie jest zarejestrowany jako lek nigdzie przez żadną agencję związaną z dopuszczaniem leków do obrotu, o czym zresztą wspomniano we wstępie (str. 34).

Przedstawione wyżej uwagi są jednak nieliczne i mają charakter w większości porządkowy, stąd nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji pracy, co upoważnia mnie do wnioskowania o wyróżnienie tej pracy.

Uważam, że **recenzowana praca zasługuje na wyróżnienie**, m.in. dlatego, iż pokaźna część wyników zamieszczonych w dysertacji została już, jak wspomniałem wyżej, opublikowana w bardzo dobrych zagranicznych specjalistycznych czasopismach naukowych o wysokim wskaźniku oddziaływania z udziałem Autorki ((Pukło R. et al. 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, Pukło R. et al. The neuroendocrine regulation of hepatic cytochrome P450 by N-methyl-D-aspartate receptors in the paraventricular and arcuate nuclei of the hypothalamus. *Drug Metal Dispos* 2025; 53: 100143). Według mojej opinii mgr inż. Renata Pukło wzorowo zrealizowała badania związane z postawionym, założonym celem pracy, a otrzymane wyniki wnoszą istotne nowe treści do współczesnej wiedzy na temat powiązań istniejących w ramach tzw. osi „mózg-wątroba”.

Podsumowując, przedstawiona do oceny **rozprawa doktorska mgr inż. Renaty Pukło spełnia warunki określone** w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.). Wnoszę więc do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie o **dopuszczenie Pani mgr inż. Renaty Pukło do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora** w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Poznań, 02.03.2026

Prof. dr hab. Przemysław Mikołajczak