Instytut Farmakologii
Polskiej Akademii Nauk

INSTYTUT FARMAKOLOGII
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Smętna 12
31-343 Kraków
Dyrektor
telefon: (12) 662 32 96
(12) 637 48 93

Centrala
telefon: (12) 662 32 20
(12) 637 40 22
fax: (12) 637 45 00
e-mail: ifpan@if-pan.krakow.pl
www.if-pan.krakow.pl

Kraków piątek, 4 listopada 2016

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANI URSZULI JANKOWSKIEJ POD TYTUŁEM: BADANIA PROTEOMICZNE W ASPEKCIE DZIAŁANIA LEKÓW PRZECIWPSYCHOTYCZNYCH W KOMÓRKACH PC12

PRACA ZOSTAŁA WYKONANA W ZAKŁADZIE BIOCHEMII FIZYCZNEJ, WYDZIAŁU BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII UNIWERSYTETU JAGIELLOŃSKIEGO

Za względów formalnych muszę parę słów poświęcić na opis rozprawy. 161 Stron jednostronnego druku podzielone na takie sekcje jak streszczenie, wykaz najczęściej stosowanych skrótów wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski końcowe, bibliografia oraz dodatek. Bibliografia to gdzieś pomiędzy 270 a 300 cytowanych prac co nie jest rekordem jak na obecne standardy prac doktorskich choć w mojej opinii liczbą stanowczo zbyt dużą. Wszystko to w schludnej granatowej oprawie introligatorskiej.

Cele jakie swoim badaniom stawia Pani mgr Urszula Jankowska są następujące:

- określenie zmian w proteomie komórek PC12 traktowanych trzema lekami neuroleptycznymi (typowymi i atypowymi) przy użyciu dwóch komplementarnych metod proteomiki ilościowej: DIGE i ITRAQ
- wytyczenie wspólnych bądź odmiennych ścieżek przekazu sygnału
- wpisanie obserwowanych zmian w obowiązujące obecnie kanony neurochemicznej patologii schizofrenii.

Cele bardzo interesujące i poznawczo ważne dla naszego rozumienia a może poszerzenia niepełnej wiedzy jak działają neuroleptyki.

Autorka pisze też że jednym z celów było rozpoznanie białek, które mogą być związane ze skutkami ubocznymi działania neuroleptyków. Tutaj mam kłopot bo bez zastosowania modelowego czynnika indukującego neurochemię schizofrenii (podanie przykładowo ketaminy) szalenie trudno rozpoznać zmiany będące przyczyną efektów ubocznych.

Ale też pozwoliłbym sobie na sformułowanie głównego temamatu pracy w odmienny sposób: stosując kilka zmiennych zależnych (podania neuroleptyków) analizuje Autorka zmiany niezależne (ekspresja białek) i co tutaj moim zdanie najistotniejsze porównuje możliwości analizy ilościowej opartej o dwie techniki DIGE i izobaryczne metkowanie ITRQ. Myślę że ten drugi aspekt widoczny z perspektywy recenzenta jest szalenie istotny dla rozwoju technik badawczych, możliwości wnioskowania o czułości zastosowanych metod analitycznych. I jeszcze jeden ważny cel: zastosowanie hodowli komórkowych (komórki PC12) jako modelu do oceny aktywności biologicznej leków przeciwpsychotycznych. Model prosty, stosunkowo łatwy wręcz idealny do uruchomienia nowych metod badawczych z dużymi perspektywami na podjęcie kolejnych bardziej wyszukanych schematów eksperymentalnych. Model który przy pewnej standaryzacji może znakomicie ułatwiać badania przesiewowe. Idealnie wręcz wymuszający konfrontację ze znakomitą pracą w J. Neurochem której Pani mgr. Urszula Jankowska jest współautorką. Warto też podkreślić nowatorski element rozprawy. Szybkie przeszukanie bazy literaturowej PubMed po hasłach proteomika haloperidol, klozapina czy risperidon dostarcza niezmiernie mało wyników (odpowiednio 13, 11 i 14 publikacji). Tak, więc temat jest atrakcyjnie nowy i ponownie budzi nadzieję że z analizy ścieżek działania neuroleptyków uda nam się w lustrzanym odbici zobaczyć mechanizmy patologii które skutkują schizofrenia).

Zanim podzielę się uwagami na temat wstępu parę słów o rozdziale wybór materiału badawczego. Otóż nie podzielam opinii Autorki, że większością badań poświęconych mechanizmom neurochemicznym schizofrenii prowadzonych jest *post-mortem*. Badania prowadzone *post-mortem* to zaledwie szczyt góry lodowej wobec setek, jeżeli nie tysięcy prac prowadzonych w różnych modelach eksperymentalnych schizofrenii, generowania wyników, które z dużym powodzeniem pozwoliły na ich translację do badań klinicznych. Zresztą zastanawiam się czy tego dywagacje są konieczne w eksperymentach, których celem jest monitorowanie zmian aktywności biologicznej komórek PC12 po inkubacji z neuroleptykami, których paleta wybrana jest nader dobrze. Tutaj na marginesie dodam, że moja penetracja w głąb cytowanych pozycji literaturowych była raczej przypadkowa, ale konstatacja, że badania nad schizofrenie prowadzone są głownie *post-mortem* wymaga jakichś przeglądowych i opiniotwórczych publikacji. Cytowane tutaj prace na uzasadnienie powyższej konstatacji takie moim zdaniem nie są.

Oczekiwałbym raczej przejrzenie bazy WEB of Science i po liczbie cytacji wyekstrahowanie czegoś istotnego.

To, czego zabrakło mi w rozdziale wybór materiału badawczego to dyskusja na temat czasów inkubacji oraz zastosowanych stężeń neuroleptyków. Stężeń sprowadzonych do wspólnego mianownika opartego na takich parametrach jak stała hamowanie oczy cokolwiek innego, tak by mieć pewność, że zastosowywane dawki neuroleptyków są równo cenne. Przykładowo w pracy Y. Tadori z 2011 – tabela 4. (Eur. J Pharmacology, 666, strony 43-52) wykazano IC50 dla hamowania produkcji cAMP stymulowanego forskoliną prowadzonych na liniach CNO z wysoką i niską ekspresją receptorów dopaminowych IC50 dla haloperidolu jest na poziomie setnych części nmola, dla risperidonu dziesiątych a klozapiny kilku dziesiętnych nmoli. Daleki jestem od upierania się, że blokowanie syntezy cAMP stymulowanego forskoliną jest optymalnym wspólnym mianownikiem dla wybrania stężeń badanych neuroleptyków, ale ilustruje jedną ze strategii doboru stężeń leków. Chciałbym poznać motywy, jakie kierowały Autorką przy wyborze stężeń neuroleptyków i przemawiających za równo cennością działania wybranych neuroleptyków. Ta równo cenność siły działania jest warunkiem koniecznym dla prawidłowego porównywania mechanizmów działania.

Czytanie wstępu było dla minie długie i żmudne. Dlatego że wkraczałem w jakiś nowy świat cytowanego piśmiennictwa, pomijania klasyków. I tak w rozdziałach opisującą dysfunkcję układu GABA-ergicznego w schizofrenii zabrakło mi prac David A. Lewis z Pittsburgh' a (przykładowo Lewis, DA; Hashimoto, T; Volk, DW, NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE tom: 6 zeszyt: 4 strony: 312-324, 2005). Jest on autorem, co najmniej kilkunastu prac przeglądowych na temat inter-neuronów GABA-ergicznych w schizofrenii i co ważne własnych prac oryginalnych przeprowadzonych *post-mortem*. To jest chyba klasyka cytacji na omawiany temat. Prace te zawierają przejrzyste zestawienia zmian w układzie GABA-ergicznym towarzyszących schizofrenii, więc ich stabelaryzowanie dostarczyć mogłoby wnikliwemu czytelnikowi dostęp do źródłowych i pełnych informacji i pozostawienie tekstu na dość powierzchownym poziomie. Kontynuując w opisie zmian transmisji dopaminergicznej w korze (spadek transmisji) i w nuclues accumbens (wzrost transmisji) warto by było sięgnąć do pracy źródłowej Carr i Seseak z roku 2000 (J. Neurosci. 15;20(10):3864-73 lub opublikowanej trochę później ich pracy przeglądowej. Ta ostatnia z przytoczonych tu prac jest wyjątkowa, bo jako chyba jedyna dostarcza informacji o potencjalnych mechanizmach odmiennej regulacji uwalniania dopaminy w korze i jądrze półleżącym przegrody. No i nie bez znaczenia jest chyba pierwsza praca kliniczna oparta o SPECT autorstwa Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, pokazująca nasilone uwalnianie dopaminy w striatum nieleczonych pacjentów cierpiących na schizofrenię (Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 8104–09) To jest the must kiedy piszemy o dopaminie i schizofrenii pamiętając o kilku innych publikacjach

potwierdzającej dopaminę podłoże schizofrenii technikami neuroobrazowania. Przy opisie teorii glutaminergicznej posiłkowałby bym się pracami: From Revolution to Evolution: The Glutamate Hypothesis of Schizophrenia and its Implication for Treatment , Moghaddam, Bita; Javitt, Daniel Neuropsychopharmacology tom: 37 zeszyt: 1 strony: 4-15 2012 oraz Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia: Moghaddam, B Neuron tom: 40 zeszyt: 5 strony: 881-884. Prace te bardzo pomagają uporządkować istniejący chaos w literaturze i może okażą się pomocne w przygotowaniu autoreferatu. Zresztą ten fragment o schizofrenii jest ponad normatywny, bo praca nie jest o schizofrenii a o neuroleptykach i wykazaniu ich aktywności biologicznej na liniach komórkowych

Fragment o neuroleptykach czyta się dość dobrze i są tutaj wszystkie kluczowe by nie powiedzieć podręcznikowe elementy opisu działania neuroleptyków. Klasyfikacja (typowe, atypowe), właściwości farmakologiczne uzupełnione o przejrzyste tabele z profilem działania receptorowego, omówienie skuteczności i efektów niepożądanych. Tutaj muszę napisać o pewnym niedosycie. Działanie neuroleptyków na poziomie receptorów dopaminowych zredukowano jedynie do blokowania receptorów D2, zapominając o całej gamie innych receptorów dopaminowych, które te leki blokują a tym samym wpływają na odmienne ścieżki przekazu wewnątrzkomórkowego od opisanego działania na receptor D2. W tym fragmencie mamy też zwięzłą tabelę opiniującą powinowactwo neuroleptyków do wybranych receptorów i aż by się chciało zapytać czy komórki PC12 są pozytywne nie tylko na obecność receptorów dopaminowych D2, serotoninowych 5-HT2A ale też tych wszystkich innych istotnych dla działania neuroleptyków (receptory adrenergiczne, histaminowe czy muskarynowe).

Wyniki opisane są spójnie i stanowią bardzo logiczną całość. Najpierw liczba zmienianych przez neuroleptyki białek po 12 i 24 godzinach inkubacji. I tutaj bardzo interesująca informacje, ITRAQ znakuje blisko 25 razy więcej zmienionych białek niż DIGE. W przypadku klozapiny i risperidonu widzimy pewną tolerancje na ich działanie po 24 godzinach w stosunku do 12 godzinnej inkubacji, podczas gdy haloperidol sieje podobne spustoszenie zarówno po 12 jak i 24 godzinach. Następnie tabele ilustrująca uzyskane zmiany które Autorka nazywa białkami różniocowymi czyli białak których ekspresja ulega statystycznie znamiennym zmianom. Mamy tutaj porównanie neuroleptyk 12 godzin inkubacji *versus* kontrola, neuroleptyk 24 godziny inkubacji *versus* kontrola. Zastanawiam się czy nie była by interesująca dodatkowa analiza statystyka neuroleptyk 12 godzin inkubacji *versus* neuroleptyk 24 godziny inkubacji. Nota bene takie porównanie zrobiono na wykresach Venna (rysunek 5.5). I dalej standardowo lokalizacja komórkowa zmienionych białek oraz wyznaczenie szlaków sygnalizacyjnych zmienianych przez neuroleptyki. Rysunek 5.7 pomysłowy nawet bardzo pomysłowy z drugiej strony mało czytelny, bo zamienienie z-score na heat mapę nie daje pewności czy przykładowo C12/K12 przy aktynie to już znamienne czy jeszcze nie. Mnie najbardziej zainteresowały

zmiany w ścieżce aktynowej. Widząc zmiany w kofilinie radził bym dość szybko powtórzyć ten efekt na westernach, dodać pomiar fosforylacji kofiliny i opublikować wynik (może jakieś białka up and dow stream). Wydaje mi się że publikacja miała by zapewniony duży sukces (zmiany plastyczne, zmiany strukturalne jako efekty terapii neuroleptykami).

Co jest jednym z celów pracy i pewnie mógłby się znaleźć w wynikach to wpisanie otrzymanych zmian w ekspresji białek po inkubacji z neuroleptykami w profil zmian obserwowanych na poziomie białek w schizofrenii. Problem szalenie ważny, może nawet ważniejszy niż grupowanie i wyznaczanie zmienionych po neuroleptych ścieżek przekazu sygnału. Ważny, bo pokazuje, co w otrzymanych wynikach może potencjalnie leczyć a co nie. Ten ważny cel został jednak osiągnięty w bardzo niewielkim stopniu z powodu jakiegoś braku wnikliwości czy powierzchowności. Prac oryginalnych ma temat schizofrenia – proteomika – analiza ekspresji białek w tkanych mózgu jest około 30. Opisują zmiany, w co najmniej trzech regionach mózgu korze czołowej, hipokampie w wzgórzu. Liczba zmienionych chorobą białek oscyluje od kilki do 130 (jak dobrze pamiętam). Ponadto w wielu z tych prac skontrastowano schizofrenie nie tylko z tkanką zdrowych osobników, ale też z tkanką osobników cierpiących na chorobę dwubiegunowa by wykazać specyficzność zmian dla schizofrenii. Piszę to bo ocenianej dysertacji z palety tych blisko 30 publikacji cytuje tylko dwie grzebiąc szansę na bardziej wnikliwą ocenę waloru terapeutycznego opisywanych zmian. Myślę że taka pogłębiona analiza będzie konieczna ale może już nie na potrzeby obrony tez doktorskich.

Czytając dyskusję w kilku miejscach Pani mgr. Urszula Jankowska o czym innym marzy co innego ma w wynikach. I tak dyskutując konsekwencje zmian w szlakach sygnalizacyjnych związanych z aktyną – cytoszkieletem czytamy o aktynie i schizofrenii, LTP/LTD schizofrenii (to marzenia) a powinno chyba być o blokadzie receptorów dopaminowych, serotoninowych noradrenergicznych w indukcji zmian plastycznych centralnego układu nerwowego (to mamy w wynikach). Już pobieżna analiza baz literaturowych serotonina / LTP dopamina / LTP dostarcza odpowiednio 160 i 350 prac oryginalnych. Jest, więc co dyskutować poza schizofrenią, bo po raz któryś podkreślę schizofrenia nie jest tu istotą badań. Zresztą potencjalne zmiany w cytoszkielecie a tym samym strukturze przestrzennej komórki, kolcach synaptycznych, (których chyba nie mają komórki PC12) jest moim zdaniem jednym z ważniejszych odkryć tej rozprawy znakomicie wpisujące się w obecne koncepcje, że za patologię odpowiadają zamiany strukturalne mózgu, i przewrócenie plastyczności lub kontroli nad nią może być wiązane z efektem terapeutycznym.

Jedną z rzeczy, której mi trochę brakuje w tej rozprawie doktorskiej to próba potwierdzenia otrzymanych zmian technikami innymi niż techniki proteomiczne. Uzyskanie podobnych zmian w jednym czy dwu białkach

krytycznych dla opisywanych szlaków znacznie by te wynik uwiarygodniło choć też zdaję sobie sprawę ze brak zmian w westernach nie jest wystarczający by podważyć wiarygodność zmian w proteomice i vice versa. Dodam że ta kwestia jest podnoszona przez Panią ale wyników brak i argument o braku możliwości zastosowaniu techniki SRM) mnie nie przekonywuje.

Czytając tę recenzję odnoszę wrażenie, że jestem bardzo krytyczny i źle nastawiony do omawianego przedsięwzięcia. Spieszę wyjaśnić ze tak nie jest. Bardzo podoba mi się podejście metodyczne, sprawność, z jaką porusza się pani w programie IPA chyba w chwili obecnej jednym z najlepszych pozwalający znaleźć ład w dziesiątkach zmieniający się białek. Podoba mi się strategia badawcza, metodyka, za co najmniej rozsądne uważam przeprowadzenie badań na liniach komórkowych eliminujących złożoność układu nerwowego. Natomiast źle się czyta, wstęp i dyskusję. Literatura cytowana jest dość chaotycznie z pomijaniem klasyki. Chyba też to był powód opóźnień w napisaniu powyższej recenzji. Wielokrotnie wracałem do bazy PubMed, bazy Web of Science by sprawdzać czy coś mi umyka i czy to co uważam za klasykę tematu dalej jest obowiązującym kanonem.

Kończąc wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Urszuli Jankowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W mojej opinii oceniana dysertacja spełnia wymagania stawione przez ustawę z dnia 13 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr.65, poz.595, z pom. zm.) wymagane do nadania stopnia naukowego doktora.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Krzysztof Wędzony
Kierownik Zakładu Farmakologii i Pracowni Biostruktury Mózgu.