



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Kraków, 16 października 2023 r.

Prof. dr hab. n. med. Anna Krygowska-Wajs
Katedra i Klinika Neurologii
Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum
Kraków

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Kingi Kamińskiej, pt. „Interakcja wybranych leków przeciwdepresyjnych z L-DOPA
w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona”

Przedłożona do recenzji praca została wykonana pod kierunkiem naukowym dr hab. Elżbiety Lorenc-Koci w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk.

Choroba Parkinsona (PD) jest postępującą, wieloukładową chorobą neurodegeneracyjną o zmiennym obrazie klinicznym i stopniu progresji, charakteryzującą się postępującym zaburzeniem funkcji ruchowych i pozaruchowych. Proces neurodegeneracji obejmuje ośrodkowy i obwodowy układ nerwowy, prowadząc do deficytów w licznych układach neurotransmisyjnych oraz zaburzeń funkcjonowania układów: dopaminergicznego (DA), noradrenergicznego (NA), serotonergicznego (5-HT) i cholinergicznego (Ach). Objawy pozaruchowe, takie jak depresja, apatia i anhedonia, często pojawiają się przed wystąpieniem objawów ruchowych choroby zgodnie z hipotezą Braaka, według której zmiany neuropatologiczne występują najwcześniej w strukturach niedopaminergicznych, z zajęciem neuronów serotonergicznych i noradrenergicznych w pniu mózgu. Depresja może występować w przedruchowym okresie choroby, a w okresie zaawansowanym często

w większym stopniu niż objawy ruchowe zaburza jakość życia chorych. Badania doświadczalne zmierzające do poznania patomechanizmów objawów PD przyczyniają się do poprawy diagnostyki i leczenia choroby.

Podjęcie przez Doktorantkę badań dotyczących mechanizmów działania leków przeciwdepresyjnych w doświadczalnym modelu PD zasługuje na szczególne uznanie.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 165 stron i składa się z przewidzianych dla tego typu opracowań: wstępu, określenia celu pracy, materiału i metodyki, wyników i dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spisu piśmiennictwa. Zamieszczono w niej również 16 tabel i 27 rycin.

Pracę wykonano w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Doświadczenia przeprowadzono zgodnie z Ustawą o ochronie zwierząt (Dz. U. nr 23/2015 poz. 266, Polska) wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych z dnia 15 stycznia 2015 r. oraz dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady Europy 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt przeznaczonych do celów naukowych, a także za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie (nr zgody 709/2010).

W starannie opracowanym obszernym wstępie Doktorantka przedstawiła obraz kliniczny PD, podłoże neuropatologiczne oraz patomechanizm zmian neurodegeneracyjnych. Szeroko omówiła metabolizm dopaminy, zwracając uwagę na objawy niepożądane stosowania lewodopy, tj. fluktuacje ruchowe, dyskinezy i zaburzenia psychiczne. Przedstawiła obraz kliniczny oraz hipotezy patofizjologii depresji, wskazując, że neurony serotoniny w jądrze szwu ulegają uszkodzeniu wcześniej niż neurony dopaminergiczne w istocie czarnej; zwróciła także uwagę na możliwość rozważania depresji jako biomarkera ryzyka rozwoju PD. Doktorantka przedstawiła metody leczenia farmakologicznego i nefarmakologicznego PD, wskazując na kontrowersje w wyborze stosowanych leków. W kolejnym podrozdziale wstępu omówiła zwierzęce modele doświadczalne PD. Przedstawienie danych z literatury wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki oraz dobrą znajomość omawianego zagadnienia.

Cele pracy zostały sformułowane jako:

1. Opracowanie doświadczalnego modelu PD, w którym degeneracja układów monoaminergicznych (DA, NA i 5-HT) w strukturach motorycznych – prążkowie (STR) i istota czarna (SN), oraz limbicznych – kora czołowa (fCTX) i hipokamp (HIP), będzie odzwierciedlać uszkodzenie tych układów oraz występowanie objawów ruchowych i depresyjnych PD.

2. Ocenę w opracowanym modelu PD interakcji trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych – amitryptyliny (AMI) i dezypraminy (DEZ), różniących się profilem farmakologicznym – podawanych samodzielnie lub w połączeniu z L-DOPA na zachowania motoryczne, zaburzenia typu depresyjnego, zmiany stężeń w strukturach motorycznych i limbicznych mózgu szczurów (STR, SN, fCTX, HIP) oraz na wiązania znakowanych ligandów do transporterów monoamin: DAT, NET i SERT w strukturach motorycznych i limbicznych mózgu szczurów.

W ramach realizacji zamierzonych celów Doktorantka wykonała badania szczegółowe.

1. Opracowanie eksperymentalnego modelu zaawansowanej PD z występowaniem zaburzeń typu depresyjnego, w którym zastosowano klasyczną neurotoksynę 6-OHDA.
 - a. przeprowadzenie oceny wpływu 3 różnych dawek 6-OHD podawanych jednostronnie do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia (MFB), wyłącznie oraz w połączeniu z dezypraminą (DEZ), na stężenie NA, DA i 5-HT w strukturach motorycznych i limbicznych mózgu szczura.
 - b. oceny wpływu 3 różnych dawek 6-OHD podawanych jednostronnie do MFB, wyłącznie oraz łącznie z DEZ, na poziom rotacji kontrlateralnych mierzony po 2 i 4 tygodniach od wykonania lezji.
 - c. oceny wpływu najwyższej dawki 6-OHD podawanej jednostronnie do MFB wyłącznie oraz w połączeniu z DEZ na anhedonię mierzoną spożyciem 3% roztworu sacharozy.
2. Doktorantka oceniała wpływ wybranych leków przeciwdepresyjnych w interakcji z L-DOPA na parametry motoryczne i biochemiczne w opracowanym modelu.
 - a. Oceniano wpływ wielokrotnych podań trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych: AMI i DEZ łącznie z L-DOPA, na zachowanie asymetryczne, preferencję spożycia sacharozy oraz na stężenia NA, DA, 5-HT oraz metabolitów w strukturach motorycznych i limbicznych mózgu szczura.
 - b. Oceniano wpływ wielokrotnych podań AMI łącznie z L-DOPA na wiązanie radioligandów do transporterów DAT, NA i 5-HT w strukturach motorycznych i limbicznych mózgu szczura.

Badania przeprowadzono na szczurach rasy Wistar. AMI oraz DEZ podawano w dawce 10 mg/kg mc., L-DOPA w 12 mg/kg mc., zastosowano grupę kontrolną. Tkankowe poziomy neuroprzekazników: NA, DA i 5-HT, oraz metabolitów: kwasu 3,4-dihydroksyfenolo-

octowego, 3-metoksytryptaminy, kwasu homowanilinowego i kwasu 5-hydroksyindolooctowego, oznaczano z użyciem wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) z elektrochemiczną detekcją kulometryczną.

Analizy statystycznej dokonano za pomocą oprogramowania STATISTICA 13 (StatSoft., USA), stosując dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla powtarzalnych pomiarów.

W rozdziale 6. Doktorantka przedstawiła wyniki badań, zebrane na 19 rycinach i w 12 tabelach. Wykazano, że największa dawka 6-OHD podawana do pęczka przyśrodkowego przodomózgowia jednostronnie, samodzielnie lub w połączeniu z DEZ, zmniejszała spożycie 3% sacharozy. Wszystkie zastosowane dawki 6-OHD zmniejszyły stężenie DA w badanych strukturach mózgu po stronie uszkodzenia. Stężenie NA było znacznie bardziej zmniejszone w STR, HIP i fCTX po stronie uszkodzonej po podaniu wyłącznym 6-OHD w porównaniu z jednoczesnym podaniem 6-OHD i DEZ. W SN podanie 6-OHD wywoływało niewielkie zmniejszenie stężenia NA po stronie podania, natomiast w połączeniu z DEZ zmniejszenie stężenia było większe i występowało obustronnie. Większe dawki 6-OHD podawane bez DEZ zmniejszały stężenie 5-HT po stronie uszkodzonej w STR, HIP i fCTX, nie wywołując zmian w SN. W dalszych badaniach Doktorantka zastosowała model PD wywołany podaniem największej dawki 6-OHD, jako najbardziej odpowiadający zaburzeniom behawioralnym i neurochemicznym występującym w PD.

Badanie wpływu AMI i DEZ podawanych wielokrotnie, oddzielnie lub łącznie z L-DOPA, wykazało, że podanie wyłączne L-DOPA lub w połączeniu z AMI lub DEZ zwiększa liczbę rotacji.

Przedstawione wnioski (w liczbie czterech) odpowiadają na pytania zawarte w celach pracy. Wynika z nich, że

- 1. Opracowany model PD wywołany jednostronnym podaniem 6-OHD w dawce 16 mg/4 µl do MFB może zostać zastosowany do oceny terapii L-DOPA w interakcji z lekami przeciwdepresyjnymi. Analiza wpływu leków przeciwdepresyjnych na zachowania motoryczne i biochemiczne w opracowanym modelu wykazała:
 - Wielokrotne podanie AMI lub DEZ nie wywoływało rotacji kontrlateralnych, natomiast L-DOPA zwiększała ich liczbę. Łączne podanie AMI i L-DOPA zwiększało istotnie rotacje kontrlateralne w

porównaniu z z wyłączeniem podaniem L-DOPA, natomiast po łącznych podaniach DEZ i L-DOPA obserwowano wyłącznie tendencje wzrostowe.

- Skojarzone podanie AMI i L-DOPA silniej wywoływało zwiększenie stężenia DA po stronie podania w STR i SN oraz obustronnie w HIP i fCTX, niż podanie wyłącznie L-DOPA.
- Łączne podanie DEZ z L-DOPA zwiększało stężenie DA w ipsilateralnym STR, SN i HIP w tym samym stopniu, co podanie L-DOPA. Jedynie w ipsilateralnej fCTX stężenie DA było wyższe po podaniu łącznym DEZ z L-DOPA niż po podaniu samej L-DOPA.

2. Wykazano silniejsze działanie promotoryczne terapii skojarzonej AMI i L-DOPA niż monoterapii L-Dopą. Natomiast łączne podanie L-DOPA i DEZ powodowało jedynie tendencje wzrostowe. Wyniki te sugerują, że leki antydepresyjne o mechanizmie działania zbliżonym do AMI silniej wpływają na aktywność ruchową indukowaną L-DOPA niż leki hamujące wychwyt zwrotny NA o mechanizmie działania podobnym do DEZ.

3. Na podstawie wyników wykazujących silniejszy wzrost stężenia DA w fCTX po łącznym podaniu AMI i L-DOPA oraz wzrost stężenia DA w HIP zarówno po łącznych podaniach AMI i DEZ i wyłącznie L-DOPA sformułowano wniosek 3., wskazując na niejednoznaczny wpływ podawania AMI i L-DOPA na funkcje psychiczne.

Analiza interakcji AMI i L-DOPA na wiązanie radioligandów do transporterów DAT, NET i SERT wykazała zmniejszenie poziomu wiązania DAT w STR i SN po stronie podania 6-OHD, po stronie przeciwnej w STR wykazano kompensacyjny wzrost wiązania DAT i SERT, w SN zmniejszenie wiązania do DAT oraz obustronne zwiększenie wiązania radioligandów do transporterów NET i SERT. Kompensacyjne zwiększenie stężenia SERT wykazano po stronie przeciwnej do uszkodzenia w HIP i fCTX. Łączne podanie AMI z L-DOPA nie wpływało na wiązanie DAT po stronie uszkodzenia, zmniejszało natomiast wiązanie radioligandów do transportera SERT we wszystkich badanych strukturach, a wiązanie do NET wyłącznie w SN.

Doktorantka sformułowala wniosek 4., że w pozbawionym unerwienia dopaminergicznego STR za wychwyt zwrotny DA odpowiedzialny jest transporter SERT, natomiast w SN zarówno SERT, jaki NET. Hamowanie funkcji tych transporterów przez AMI poprzez zwiększenie zewnątrzkomórkowego stężenia DA w STR i SN może wpływać na funkcje motoryczne.

Podjęty przez Doktorantkę temat jest istotny z naukowego i praktycznego punktu widzenia. PD, druga co do częstości choroba neurodegeneracyjna, jest poważnym problemem klinicznym i społecznym i wraz ze starzeniem się populacji stanowi duże wyzwanie dla systemów opieki na całym świecie. Badania patomechanizmów działania leków przeciwdepresyjnych są istotne z perspektywy lepszego zrozumienia patogenezы oraz leczenia PD. Wnioski z tej pracy są interesujące, mają wartość naukową oraz praktyczną i stanowią oryginalny wkład w wiedzę na temat patomechanizmu PD, wskazując na potrzebę dalszych badań zmierzających do poznania patogenezы PD, obejmujących badania leków przeciwdepresyjnych, także o innym mechanizmie działania niż AMI i DEZ, odznaczających się szerszym zakresem terapeutycznym i mniejszą kardiotoxycznością niż trójpierścieniowe leki p-depresyjne.

Praca została przygotowana bardzo starannie, dużym nakładem pracy. na liście skrótów zabrakło stosowanego w pracy skrótu APO – apomorfina.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. 2016, poz. 882).

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie o dopuszczenie mgr Kingi Kamińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. n. med. Anna Krygowska-Wajs
specjalista neurolog
9054198 980630969