



ZAKŁAD FARMAKOLOGII
Wydział Nauk o Zdrowiu
UNIwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin
tel./fax. (81) 448-67-72
e-mail: tomasz.plech@umlub.pl
Kierownik:
dr hab. Tomasz Plech, prof. uczelni

Lublin, dnia 07.05.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Ocena właściwości neuroprotektoryjnych oraz wpływu na neurogenezę nowej pochodnej kwasu 2-(2,5-diokspiroolidyno-1-yl)-2-propanowego oraz wybranych leków przeciwpadaczkowych w badaniach *in vivo*” autorstwa mgr Aleksandry Szewczyk

Niniejsza recenzja została sporządzona w odpowiedzi na pismo Dyrektora Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie – prof. nzw. dr hab. n. med. Lecha Panasiuka, z dnia 21.04.2021 r. i w związku z powołaniem mnie przez Radę Naukową Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie, w dniu 01.03.2019 r., na recenzenta w przewodzie doktorskim mgr Aleksandry Szewczyk.

Rozprawa doktorska pt. „Ocena właściwości neuroprotektoryjnych oraz wpływu na neurogenezę nowej pochodnej kwasu 2-(2,5-diokspiroolidyno-1-yl)-2-propanowego oraz wybranych leków przeciwpadaczkowych w badaniach *in vivo*” autorstwa mgr Aleksandry Szewczyk została przygotowana w Samodzielnej Pracowni Analiz Izoblograficznych (IMW Lublin) pod promotorską opieką dr hab. n. med. Marty Andres-Mach, profesora IMW oraz przy udziale promotora pomocniczego - dra n. biol. Mirosława Zagai.

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Szewczyk ma postać maszynopisu książki opatrzonego streszczeniem w języku polskim i angielskim, spełnia więc kryteria opisane w art. 13 ust. 2 oraz ust. 6 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku poz. 1789 ze zm.). Struktura rozprawy doktorskiej jest prawidłowa, składają się na nią następujące rozdziały: wstęp, cel pracy, materiały i metody badań, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz

skrótów zastosowanych w pracy, wykaz rycin i tabel oraz spis literatury. Całość rozprawy doktorskiej została przedstawiona na 121 stronach maszynopisu. Spis literatury jest bogaty i liczy 257 pozycji, które są właściwie cytowane w pracy.

We wstępie recenzowanej pracy Doktorantka przedstawia ogólną charakterystykę padaczki, klasyfikację napadów padaczkowych zgodną z aktualnymi wytycznymi Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej, patomechanizm napadów padaczkowych (np. udział kanałów jonowych, układu gabaergicznego i glutaminianergicznego w powstawaniu napadów), metody diagnozowania i leczenia padaczki. Następnie Doktorantka przechodzi do opisu zjawiska neurogenezy oraz neuroprotekcji i kończy wstęp opisem związków chemicznych, leków i związku C11, stanowiących główny obiekt badań w realizowanym projekcie naukowym. Zaprezentowane we wstępie informacje korespondują z problemem badawczym pracy doktorskiej i świadczą o merytorycznym przygotowaniu Doktorantki do zajęcia się tą tematyką.

W rozdziale 2 Doktorantka jasno sformułowała cel prowadzonych badań. Celem tym była ocena skutków długotrwałego podawania nowego kandydata na lek przeciwpadaczkowy z grupy pochodnych piroolidyno-2,5-dionu, tj. związku oznaczonego symbolem C11, oraz trzech leków przeciwpadaczkowych – etosuksymidu (ETS), lakozamidu (LCM) oraz lewetyracetamu (LEV). Taki dobór leków przeciwpadaczkowych użytych w badaniach jest uzasadniony i podyktowany faktem, iż to elementy struktury tych właśnie leków posłużyły grupie badawczej profesora Krzysztofa Kamińskiego z Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM do zaprojektowania i zsyntetyzowania związku C11. W ramach projektu badawczego postanowiono ocenić potencjalne właściwości neuroprotektoryjne wspomnianych leków i związku C11 oraz ich wpływ na procesy apoptozy, degeneracji i neurogenezy komórek nerwowych. Oceniono również efekty długotrwałego podawania wspomnianych związków na orientację przestrzenną i umiejętność uczenia się i zapamiętywania u myszy w teście behawioralnym – labiryncie wodnym Morrisa. Podjęcie badań we wspomnianym zakresie jest ze wszechmiar pożądane gdyż skuteczność leczenia farmakologicznego padaczki jest ciągle niewystarczająca. Pomimo wprowadzenia na rynek wielu nowych leków przeciwpadaczkowych nie udało się ograniczyć odsetka tych pacjentów, u których brak jest klinicznych efektów poprawy stanu zdrowia i komfortu życia. Nadal u blisko 30% pacjentów stwierdza się lekooporną odmianę choroby. Co więcej, dostępne leki przeciwpadaczkowe znoszą lub ograniczają objawy choroby, natomiast nie mają wpływu na toczący się proces epileptogenezy. Mając na uwadze, że padaczka jest chorobą o bardzo złożonym

patomechanizmie, zasadne jest testowanie nowych związków chemicznych o skuteczności przeciwdrgawkowej potwierdzonej w zwierzęcych modelach padaczki i znoszących patologiczną impulsację w ośrodkowym układzie nerwowym poprzez jednoczesny wpływ na kilka różnych punktów uchwytu. Związkiem o takiej charakterystyce jest właśnie nowa pochodna pirolidyno-2,5-dionu, oznaczona symbolem C11. Dotychczasowe badania tego związku koncentrowały się na ustaleniu molekularnego mechanizmu działania, właściwości farmakokinetycznych, skuteczności w różnych modelach padaczki (w tym padaczki lekoopornej), bezpieczeństwa stosowania po jednorazowym podaniu czy potencjalnego zastosowania w znoszeniu bólu, w tym również bólu neuropatycznego. Prowadzone przez Doktorantkę badania, koncentrujące się na ocenie skutków długotrwałego podawania związku C11 w relacji do procesów zachodzących w mózgu (neurogeneza, apoptoza komórek nerwowych, degeneracja) oraz potencjalnego wpływu na funkcje poznawcze wypełnia lukę w zakresie kompleksowej charakterystyki tego konkretnego kandydata na lek przeciwpadaczkowy i stanowi o nowatorskim charakterze rozprawy doktorskiej. Co istotne, w badaniach zaplanowano i przeprowadzono wielokierunkową ocenę efektów działania związku C11 oraz wybranych leków przeciwpadaczkowych (ETS, LCM, LEV) poprzez połączenie testu behawioralnego (labirynt wodny Morrisa) z nowoczesnymi technikami obrazowania (rezonans magnetyczny, mikroskopia konfokalna, barwienie immunofluorescencyjne). Sposób realizacji założonych celów badawczych w sugestywny sposób przedstawiono na rycinach 9 – 11 oraz opisano w rozdziale 3 rozprawy doktorskiej („Materiały i metody badań”). Najważniejszy element rozprawy doktorskiej stanowią rozdziały 4 i 5, w których Doktorantka kolejno prezentuje uzyskane wyniki oraz wnikliwie je analizuje i konfrontuje z danymi literaturowymi. W toku prowadzonych eksperymentów Doktorantka wykazała, że żaden z testowanych związków (C11, ETS, LCM, LEV) podawanych długotrwanie nie wywoływał zmian degeneracyjnych ani nie indukował apoptozy w komórkach nerwowych hipokampa myszy. Ponadto, związek C11 nie miał negatywnego wpływu na proces neurogenezy w obrębie hipokampa, co Doktorantka potwierdziła w oparciu o oszacowaną w tym obszarze całkowitą liczbę komórek wyznakowanych przy pomocy BrdU, jak również bazując na selektywnym wybarwianiu i zliczaniu astrocytów i neuronów. Z kolei w grupie testowanych leków przeciwpadaczkowych tylko LCM zmniejszał, w statystycznie istotny sposób, całkowitą liczbę komórek BrdU-dodatnich. Istotny statystycznie, negatywny wpływ na populację nowopowstałych astrocytów miały wszystkie przebadane leki, a na populację neuronów – LCM i LEV. Dzięki zastosowaniu obrazowania MRI Doktorantka wykazała, że długotrwała ekspozycja na związek C11 oraz ETS nie wpływa na zmianę poziomu neurometabolitów ważnych z punktu

widzenia neurogenezy, podczas gdy LEV i LCM powodowały istotny statystycznie wzrost poziomu N-acetyloasparagianu w hipokampie myszy. Stosując metodę labiryntu wodnego Morrisa Doktorantka udowodniła, że związek C11, podobnie jak ETS i LEV, a przeciwnie do LCM, nie ograniczał funkcji poznawczych, zdolności uczenia się i zapamiętywania u myszy. W ostatnim etapie badań Doktorantka potwierdziła, znany z literatury, efekt neuroprotekcyny LEV i jednocześnie wykazała, że związek C11 nie chronił przed indukowanym podaniem pilokarpiny uszkodzeniem neuronów.

Bazując na uzyskanych wynikach Pani mgr Aleksandra Szewczyk przeprowadziła wszechstronną i wnikliwą dyskusję. Doktorantka z dużą swobodą porusza się w obrębie literatury przedmiotu, celnie przywołuje wyniki uzyskane przez innych badaczy i na ich tle pozycjonuje rezultaty własnej pracy. Co w mojej opinii zasługuje na uwagę i docenienie to fakt, że Doktorantka nie boi się przywoływać w dyskusji również tych danych literaturowych, które wskazują na odmienny od zaobserwowanego w toku własnych badań doktorskiej efekt działania leków przeciwpadaczkowych. W każdym z takich przypadków Doktorantka była bowiem w stanie odnieść się merytorycznie do zauważonych różnic. W tym miejscu należy również wskazać na stopień złożoności problemu badawczego dotyczącego wpływu substancji egzogennych na proces neurogenezy. Doskonałym tego przykładem są rozważania przedstawione na stronach 76-77, poparte adekwatnie zacytowaną literaturą, a dotyczące indukcji lub hamowania neurogenezy przez LEV w zależności od zastosowanego modelu doświadczalnego, dawki leku i czasu jego podawania. Z oczywistych względów najmniejsze możliwości konfrontowania wyników własnych z danymi literaturowymi dotyczą związku C11, który jako stosunkowo nowy, był dotychczas badany jedynie w zespole naukowym profesora Krzysztofa Kamińskiego.

Opierając się na zebranych wynikach Doktorantka wysunęła szereg konkluzyjnych wniosków, które zostały przedstawione w rozdziale 6. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę, że sposób sformułowania wniosku nr 3 jest jednak nieco pobieżny, bazuje wyłącznie na rezultatach zaprezentowanych na rycinie 21 i nie bierze pod uwagę wyników przedstawionych na rycinach 22 i 23. Z kolei występujące we wniosku nr 2 stwierdzenie: „co potwierdza brak skutków ubocznych” wydaje się niepotrzebne, gdyż wywołuje w czytelniku wrażenie jakoby wymienione tam związki (C11, ETS, LEV) były całkowicie pozbawione skutków ubocznych. Z recenzenckiego obowiązku odniosę się również do innych nieścisłości i braków, które zauważyłem w trakcie lektury niniejszej rozprawy:

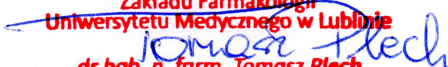
- 1) w rozdziale 4.1 (str. 56) przy opisie wpływu długotrwałego podawania testowanych związków na proces neurodegeneracji Doktorantka stwierdza, że „pominięto ocenę ilościową, a wyniki przedstawiono w formie analizy jakościowej”, przy czym jednocześnie pisze, że „wyniki nie wykazały istotnych statystycznie zmian”. Skoro nie przeprowadzono analizy ilościowej to na jakiej podstawie wysunięto wniosek co do braku istotności statystycznej różnic pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt?
- 2) na rycinie 16 (str. 58) zdjęcie „A” jest wykonane przy innym powiększeniu aniżeli pozostałe (B-F); czy przy zastosowaniu podobnego powiększenia dla skrawków na zdjęciach B-F nadal nie stwierdzano w nich obecności komórek o cechach apoptotycznych?
- 3) w rozdziale 4.3.3 (str. 63) Doktorantka odnosząc się do średniego czasu płynięcia w wyznaczonym torze stwierdza, że „parametr ten, podobnie jak poprzednie, był istotnie statystycznie wyższy dla myszy z grupy LCM”, podczas gdy rycina 19 pokazuje wyraźnie, że w grupie LCM wartość wspomnianego parametru była jednak niższa w porównaniu do grupy kontrolnej;
- 4) moim zdaniem przedstawiona na stronach 82-83 charakterystyka aktywności farmakologicznej związku C11, opierająca się na wcześniej przeprowadzonych badaniach, powinna zostać umieszczona we wstępie rozprawy jako jeden z elementów uzasadniających potrzebę dalszych badań;
- 5) w rozdziale 1.9 (str. 24) widnieje nieprawidłowe tłumaczenie tekstu źródłowego (sformułowanie „activation of a number of catabolic enzymes” zostało przetłumaczone jako „aktywuje liczbę enzymów katabolicznych”)
- 6) w tytule rozprawy doktorskiej prawidłowa pod względem chemicznym nazwa kwasu, prekursora związku C11, powinna brzmieć „kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-yl)-2-propanowy” a nie „kwas 2-(2,5-dioksopirolidyn-1-yl)-2-propanowy”
- 7) rozprawa zawiera pewne błędy językowe oraz dyskusyjne sformułowania, np.:
 - trudno zgodzić się ze stwierdzeniem (str. 26, 4 wers od dołu), że modyfikacje chemiczne obecnie dostępnych leków przeciwpadaczkowych mogą poskutkować otrzymaniem nowych związków, które byłyby całkowicie pozbawione jakichkolwiek działań niepożądanych (analizując historię farmakologii trudno znaleźć przykłady leków pozbawionych działań niepożądanych);
 - stwierdzenie „ETS, LEV i LCM, które tworzą cząsteczkę związku C11” (str. 37) jest raczej skrótem myślowym i uproszczeniem, gdyż wspomniane leki nie tworzą związku C11,

a jedynie pewne fragmenty ich struktur zostały wykorzystane na etapie projektowania struktury związku C11;

- zasadą językową jest, że nie rozpoczyna się zdań od liczb zapisanych cyframi (tak jak to Doktorantka uczyniła dwukrotnie na stronie 55) – należało w tym wypadku albo zastosować zapis słowny liczby albo inaczej sformułować zdanie, np. zamiast „30 minut przed podaniem...” napisać „Na 30 minut przed podaniem...”;
- stosowanie określenia „ilość” zamiast „liczba” w stosunku do rzeczowników policzalnych (np. komórek, neuronów, str. 66-67);
- zapis stężenia mikromolowego (str. 75) w postaci „ μM ” (co oznacza mikrometr) zamiast μM ;
- stosowanie zapisu „nie mniej jednak” (str. 76 i 81) zamiast „niemniej jednak”;
- literówki w wyrażeniach „czystość i jednorodność związku oceniana została” (str. 34) zamiast „oceniona została”, „wykazuje lepsze właściwości” (str.36) zamiast „właściwości”.

Na szczęście przytoczone powyżej uwagi nie wpływają negatywnie na czytelność rozprawy doktorskiej oraz nie umniejszają jej wartości naukowej.

Na podstawie lektury rozprawy doktorskiej pt. „Ocena właściwości neuroprotektoryjnych oraz wpływu na neurogenezę nowej pochodnej kwasu 2-(2,5-diokspiroolidyno-1-yl)-2-propanowego oraz wybranych leków przeciwpadaczkowych w badaniach *in vivo*” stwierdzam, że Pani mgr Aleksandra Szewczyk wykazała się ogólną wiedzą teoretyczną w zakresie dyscypliny nauki o zdrowiu, umiejętnością samodzielnego prowadzenia prac naukowych a przygotowana przez Nią rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego przedstawionego we wstępie pracy. W związku ze spełnieniem warunków formalnych określonych w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku poz. 1789 ze zm.) stawiam wniosek o przyjęcie recenzowanej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie jej do publicznej obrony. Z kolei mając na uwadze istotne walory poznawcze pracy, możliwość praktycznego wykorzystania zaprezentowanych wyników oraz fakt ich opublikowania w prestiżowym czasopiśmie *Neuropharmacology* (IF 4,431; 140 pkt. MNIŚW) wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Aleksandry Szewczyk.

Kierownik
Zakładu Farmakologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

dr hab. n. farm. Tomasz Plech
profesor uczelni