

Prof. UJ dr hab. Krzysztof Kamiński
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej, Zakład Chemii Leków
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków



Ocena

pracy doktorskiej pt. „*Wpływ ksantotoksyny (8-metoksypsoralenu) na ochronne działanie wybranych leków przeciwpadaczkowych w teście drgawek psychoruchowych (6 Hz) u myszy*” wykonanej przez mgr Jarosława Ryszarda Bryda w Samodzielnej Pracowni Badań Izobolograficznych Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Marty Andres-Mach – promotora i dr Mirosława Zagaja – promotora pomocniczego

Recenzja została przygotowana na prośbę Dyrektora Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie, prof. nzw. dr hab. n. med. Lecha Panasiuka z dnia 17 września 2019 r.

Padaczka jest jedną z najczęstszych i niezwykle wyniszczających chorób neurologicznych. Schorzenie to dotyka 1-2% populacji ludzkiej i w istotnym stopniu obniża jakość życia chorych na wielu jego płaszczyznach - osobistej, zawodowej i społecznej. Patofizjologia padaczki jest niezwykle złożona, niemniej jednak przyczyną wystąpienia napadu padaczkowego są zaburzenia przewodnictwa neuronalnego prowadzące do zwiększonej pobudliwości i gwałtownej depolaryzacji neuronów zlokalizowanych w określonym obszarze (tzw. ognisku) lub/i całym mózgu. Zasięg i rodzaj wyładowań neuronalnych ma bezpośrednie przełożenie na obserwowane objawy kliniczne oraz na dobór optymalnego postępowania terapeutycznego zarówno farmakologicznego, jak i metod nefarmakologicznych (przede wszystkim w przypadku padaczki lekoopornej). Warto nadmienić, iż patomechanizm napadu padaczkowego związany jest z defektami funkcjonalnymi kanałów jonowych zlokalizowanych na neuronach OUN w tym przede wszystkim kanałów sodowych, wapniowych (zarówno wysoko-, jak i niskonapięciowych), kanałów potasowych, a także wynika z zaburzenia równowagi pomiędzy pobudzającą ośrodkową neurotransmisją glutaminergiczną oraz hamującym neuroprzekaznictwem GABA-ergicznym. Dlatego też mechanizmy działania leków przeciwpadaczkowych polegają na normalizującym wpływie na ww. kanały jonowe oraz wspomniane układy neuroprzekazników. Obecnie leczenie dysponuje znaczną liczbą leków przeciwpadaczkowych zarówno konwencjonalnych, tzw. klasycznych lub pierwszej generacji, stosowanych od wielu lat, jak i leków należących do nowej generacji (drugiej i trzeciej), implementowanych do leczenia począwszy od lat 90-tych. Analiza ich skuteczności pokazuje

jednak, że niezmiennie ponad 30% chorych nie reaguje satysfakcjonująco na zastosowane leczenie, a taką postać choroby określa się terminem padaczka lekooporna. Podstawowe postępowanie lecznicze polega w tym przypadku na farmakoterapii skojarzonej, natomiast w ostatnich latach coraz częściej wykorzystuje się metody alternatywne, wśród których wymienić należy m.in. zabiegi neurochirurgiczne polegające, jeżeli to możliwe, na resekcji ogniska padaczkowego, głęboką stymulację mózgu, stymulację nerwu błędnego i dietę ketogeniczną. **Warto w tym miejscu podkreślić, iż wspomniane metody farmakologiczne i niefarmakologiczne zostały ciekawie i wyczerpująco opisane we wstępie rozprawy doktorskiej.** Kontrolowanie napadów lekoopornych wymaga najczęściej zastosowania kombinacji dwóch lub nawet trzech substancji leczniczych, najkorzystniej o różnych mechanizmach działania, dzięki czemu możliwe jest znaczne wydłużenie okresów międzynaapadowych i co za tym idzie, niezwykle pożądana, poprawa jakości życia chorych epileptycznych. Dobór optymalnych kombinacji lekowych, zarówno z punktu widzenia skuteczności działania, jak i bezpieczeństwa terapeutycznego analizowany jest w przedklinicznych badaniach izobolograficznych, prowadzonych w wielu ośrodkach na świecie w tym ośrodku lubelskim reprezentowanym przez m.in. Uniwersytet Medyczny oraz Instytut Medycyny Wsi, które posiadają wieloletnią i ugruntowaną pozycję w tym obszarze badawczym. Pozytywne wyniki wspomnianych badań dają podstawę do dalszych wielokierunkowych testów, w tym również klinicznych, oceniających m.in. bezpieczeństwo, czego odległym, ale bardzo oczekiwanym celem, jest zastosowanie danej kombinacji lekowej w farmakoterapii. Badania ostatnich lat wskazują na niezwykle duży potencjał terapeutyczny wynikający z kojarzenia leku przeciwpadaczkowego z substancjami pochodzenia naturalnego, które w większości przypadków są dobrze tolerowane przez ludzi. Bez wątpienia, najciekawszym przykładem jest kannabidiol (CBD), pozyskiwany z kwiatostanów konopi indyjskich, który został dopuszczony do terapii skojarzonej padaczki lekoopornej, przede wszystkim zespołu Lennox'a-Gastaut'a oraz zespołu Dravet'a, przez amerykańską agencję *Food and Drug Administration* (FDA) - 25 czerwca 2018 r. **Mając na uwadze powyższe fakty problematyka poruszona w niniejszej rozprawie doktorskiej, dotycząca oceny wpływu ksantotoksyny, będącej naturalnie występującą w wielu roślinach furanokumaryną, na efekt przeciwdrgawkowy w teście drgawek 6 Hz (u myszy), dla znanych i powszechnie stosowanych leków przeciwpadaczkowych – fenobarbitalu, kwasu walproinowego, lewetyracetamu i lakoamidu, jest aktualna, nowatorska i w pełni uzasadniona. Ponadto, proponowany zakres badań stanowi kontynuację, a zarazem rozwinięcie tematyki badawczej realizowanej od wielu lat w Samodzielnej Pracowni Badań Izobolograficznych**

IMW, która zapoczątkowana została przez prof. dr hab. Jarogniewa Jacka Łuszczki i jest nieustannie kontynuowana w ww. jednostce. Dlatego też wyniki otrzymane przez Doktoranta, podparte doświadczeniem i dobrym warsztatem badawczym pracowni, uważam za wiarygodne i rzetelne. Warto w tym miejscu również podkreślić, iż zastosowany model drgawek psychomotorycznych indukowanych prądem o niskiej częstotliwości (6 Hz, 32 mA) jest jednym z podstawowych i najważniejszych testów wykorzystywanych do oceny aktywności przeciwdrgawkowej kandydatów na nowe leki, co niezwykle istotne odpowiada on ludzkim lekoopornym napadom częściowym złożonym.

Rozprawa doktorska ma formę monografii, napisana została w języku polskim, składa się z 6 rozdziałów; streszczenia w języku polskim i angielskim; pomocnego dla czytelnika wykazu zastosowanych skrótów; wykazu tabel i rycin oraz literatury zorganizowanej w porządku alfabetycznym, która obejmuje aż 302 pozycje. Piśmiennictwo zostało dobrane w sposób trafny, obejmuje w głównej mierze nowe pozycje, natomiast **mając na uwadze eksperymentalny charakter badań spis ten wydaje się mi zbyt obszerny**. Całość pracy doktorskiej przedstawiona jest na 118 stronach, posiada typowy dla tego typu opracowań układ stanowiący spójną całość, tj. wstęp, cel pracy, materiały i metody badań, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie, stosowne wykazy i piśmiennictwo. Opis uzupełnia 14 rycin i 11 tabel ilustrujących w głównej mierze uzyskane rezultaty. **Manuskrypt zorganizowany jest w sposób przejrzysty i logiczny, podzielony został dodatkowo na podrozdziały, co w szczególności ułatwia analizę otrzymanych wyników, a także umożliwia łatwe podążanie za tokiem myślowym Autora, szczególnie w aspekcie stawiania i rozwiązywania hipotez badawczych, planowania doświadczeń, dyskusowania danych oraz finalnie wyciągania wniosków końcowych z przeprowadzonych eksperymentów.**

We wstępie niniejszej rozprawy Autor krótko charakteryzuje schorzenie jakim jest padaczka, a następnie przedstawia klasyfikację napadów padaczkowych, padaczek i zespołów padaczkowych w oparciu o najnowsze wytyczne Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej. W rozdziale tym Kandydat w sposób interesujący opisuje aktualnie znane i opisane w literaturze patomechanizmy napadów padaczkowych, w tym m.in. rolę układu glutaminergicznego, GABA-ergicznego, kanałów jonowych dla sodu, wapnia i potasu, a także cytokin i innych mediatorów procesu zapalnego. Kontynuując rozważania, Autor skupia się na zagadnieniach związanych z farmakoterapią padaczki, mechanizmach działania leków przeciwpadaczkowych oraz, co bardzo cenne, wskazuje również na efekty neuroprotektoryjne wybranych substancji leczniczych, m.in. pregabaliny, lewetyracetamu, wigabatryny, felbamatu, tiagabiny i topiramatu, dzięki czemu fragment ten koresponduje bezpośrednio

z tematyką badawczą poruszoną w rozprawie. **Dyskusyjną sprawą jest natomiast określenie w tym rozdziale działań niepożądanych leków przeciwpadaczkowych terminem skutki uboczne**, bowiem w wielu przypadkach działania uboczne mogą okazać się korzystne (patrz działanie przeciwbólowe pregabaliny, która obecnie nie jest wykorzystywana w terapii padaczki, a w bólu o podłożu neurologicznym). Wprowadzenie rozprawy uzupełnia charakterystyka chemiczno-farmakologiczna leków wykorzystanych w badaniach kolejno fenobarbitalu, kwasu walproinowego, lakoamidu i lewetyracetamu oraz opis stosowanych aktualnie zwierzęcych testów/modeli napadów padaczkowych, a także specyficznych typów padaczki w tym jej odmiany lekoopornej. Rozdział zamyka wyczerpujący i ciekawy opis kumaryn, który uwzględnia ich podział ze względu na budowę chemiczną oraz wskazuje na wielokierunkową aktywność biologiczną, w tym m.in. działanie przeciwwazopasne, przeciwdępresyjne, przeciwlękowe, prokognitywne, przeciwpasychotyczne, neuroprotektoryjne oraz kluczywe dla rozprawy działanie przeciwdrgawkowe. Na uwagę zasługuje fakt, iż efekt przeciwdrgawkowy został potwierdzony w teście maksymalnego elektroshoku (MES) dla znanych kumaryn - imperatoryny, ostolu, umbeliferonu oraz ksantotoksyny, która została wykorzystana w badaniach mgra Jarosława Bryda. Dodatkowo w przypadku wspomnianej furanokumaryny (ksantotoksyny), wykazano, iż jej kombinacje z lekami przeciwpadaczkowymi skutkowały obniżeniem dawek efektywnych w teście maksymalnego elektroshoku (MES) na myszach dla karbamazepiny, okskarbazepiny, kwasu walproinowego, lakoamidu, pregabaliny i topiramatu. **Warto podkreślić, iż wyniki te zostały otrzymane w tutejszej jednostce, dlatego też niezwykle istotne wydaje się kontynuowanie prac badawczych mających na celu ocenę interakcji ksantotoksyny z lekami przeciwpadaczkowymi w innych modelach drgawek padaczkowych, w tym przede wszystkim w proponowanym przez Doktoranta teście 6 Hz. Z tego względu problematyka rozprawy doktorskiej wydaje mi się bardzo aktualna i uzasadniona z naukowego, ale również praktycznego punktu widzenia.**

Całość wstępu zajmuje aż 39 stron, co stanowi blisko połowę manuskryptu, wyłączając streszczenie, wykaz tabel i rycin oraz piśmiennictwo. W moim odczuciu jest to rozdział zbyt obszerny, przez co zachwiane zostały ogólnie przyjęte proporcje części teoretyczna/część eksperymentalna dla tego typu opracowań. Natomiast należy podkreślić, iż rozdział ten jest ciekawy i koresponduje ściśle zarówno z tematyką samej rozprawy, jak i badaniami opisanymi w dalszej części pracy.

Do zasadniczych celów badań, oprócz oceny interakcji ksantotoksyny z wybranymi lekami przeciwpadaczkowymi tj. fenobarbitem, kwasem walproinowym, lewetyracetamem

i lakoamidem w teście drgawek 6 Hz (32 mA), należały dodatkowo: analiza działań niepożądanych kombinacji ksantotoksyna-lek przeciwpadaczkowy, która uwzględniała wpływ na koordynację ruchową, pamięć długotrwałą oraz siłę mięśni szkieletowych myszy; zbadanie rodzaju interakcji farmakokinetyczna lub/i farmakodynamiczna poprzez określenie wpływu ksantotoksyny na stężenie leków przeciwpadaczkowych w homogenatach mózgów myszy metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią masową (LC/MS/MS) oraz ocena działania neuroprotektynowego w uszkodzeniach neuronów hipokampa indukowanych pilokarpiną. **Wszystkie doświadczenia zostały opisane przez Doktoranta satysfakcjonująco w części eksperymentalnej rozprawy w oparciu o doniesienia literaturowe, a także wcześniejsze wyniki badań własnych prowadzonych w jednostce. Warto podkreślić, iż uzyskane dane oraz ich szczegółową dyskusję poparto adekwatnymi testami statystycznymi, co niewątpliwie świadczy o dobrym przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia badań naukowych. Uwagę przykuwa również znaczna ilość zwierząt wykorzystanych do testów (łącznie 600 myszy), co z całą pewnością wskazuje na jego duże zaangażowanie w pracy eksperymentalnej i wynika ponadto z kompleksowego charakteru postawionych celów badawczych, obejmujących zarówno badania *in vivo*, jak i *in vitro*. Co istotne, w przypadku testów *in vivo* zostały one zaakceptowane przez Komisję Etyczną działającą przy Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie. Z uwagi na multidyscyplinarny charakter prezentowanych badań, moim zdaniem, w części eksperymentalnej rozprawy należy określić, które z badań zostały wykonane przez Doktoranta, a które z testów wykonano w jednostkach zewnętrznych.**

Do głównych osiągnięć Doktoranta wynikających z przeprowadzonych badań należy przede wszystkim udowodnienie korzystnej interakcji pomiędzy ksantotoksyną zastosowaną w dawce 50 mg/kg i dwoma lekami przeciwpadaczkowymi, mianowicie kwasem walproinowym oraz lewetyracetamem, natomiast interakcji tej nie obserwowano dla fenobarbitalu i lakoamidu. Na uwagę zasługuje również fakt, iż uzyskane wyniki wskazują na odmienny charakter wspomnianych interakcji, w przypadku kwasu walproinowego ma podłoże farmakokinetyczne, natomiast dla lewetyracetamu, najprawdopodobniej farmakodynamiczne. Co niezwykle korzystne, kombinacje te, ale również połączenia ksantotoksyny z fenobarbitem lub lakoamidem, nie upośledzały w sposób istotny koordynacji ruchowej myszy w teście komina, siły ich mięśni szkieletowych w teście chwytania oraz pamięci długotrwałej w teście biernego unikania. Badania *in vitro* pokazały, iż sama ksantotoksyna podana myszom w dawce 50 mg/kg, jak również jej kombinacje z lewetyracetamem (w dawce 2,83 mg/kg) oraz kwasem walproinowym (w dawce 44,44 mg/kg) były pozbawione działania

neuroprotekcynowego w obrębie hipokampa myszy w uszkodzeniach indukowanych pilokarpiną (w dawce 300 mg/kg). Działanie neuroprotekcynowe obserwowano natomiast dla wspomnianych leków zastosowanych w dużo wyższych dawkach 19,37 mg/kg dla lewetyracetamu oraz 92,89 mg/kg dla kwasu walproinowego, które to odpowiadają ich wartością ED_{50} w teście drgawek 6 Hz (32 mA). Moim zdaniem, dla pełniejszego obrazu działania ksantotoksyny w obrębie hipokampa, a przede wszystkim w celu wykluczenia jej potencjalnego działania neurodegeneracyjnego, powinny zostać przeprowadzone dodatkowe testy, w których zostanie ona podana w kombinacji z lewetyracetamem i kwasem walproinowych zastosowanych w dawkach, w których obserwowano ich działanie neuroprotekcynowe.

Podsumowując, uzyskane wyniki, uważam z całym przekonaniem za oryginalne i wartościowe, a formę ich dyskusji za satysfakcjonującą i na tym etapie wyczerpującą. Należy podkreślić, iż zastosowanie aktywnej kombinacji ksantotoksyna - lek przeciwpadaczkowy wymaga dalszych bardzo szczegółowych badań, farmakokinetycznych, farmakodynamicznych i przede wszystkim toksykologicznych. Badania ujęte w rozprawie doktorskiej zostały zaplanowane w sposób logiczny i konsekwentnie zrealizowane. Doktorant w sposób jasny formułuje zakładane cele, umiejętnie dobiera odpowiednie narzędzia badawcze, planuje kolejne eksperymenty, co uważam za bardzo cenne dla prac doświadczalnych.

Z obowiązku Recenzenta jestem zobligowany do zwrócenia uwagi na kilka nieścisłości, niedopatrzeń i błędów, które znajdują się w rozprawie. Chciałbym podkreślić, iż moje uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają oryginalności, waloru poznawczego prezentowanych wyników oraz wkładu otrzymanych danych w rozwój szeroko rozumianych nauk o zdrowiu, natomiast należy traktować je jako sugestie, które umożliwią przygotowanie dobrego materiału do publikacji.

- We Wstępie, s. 6, pominięta została charakterystyka metabotropowych receptorów glutaminergicznych, w szczególności mGluR1 i mGluR5, których dysfunkcja jest istotna w patomechanizmie napadów padaczkowych; s. 8, wyjaśnienia wymaga określenie dotyczące receptora GABA-A mianowicie „białko wielonukleinowe”; s. 20, w Tabeli 3 mechanizm działania dla fenobarbitalu jest błędny; ponadto moim zdaniem warto określić typ kanału wapniowego, na który działają poszczególne leki; s. 23, 24, 26 i 27, ilości atomów we wzorach sumarycznych pisze się w indeksie dolnym, dodatkowo konsekwentnie warto podać nazwy chemiczne dla wszystkich leków (w rozprawie widnieje nazwa jedynie dla lakozamidu). W przypadku opisu budowy chemicznej fenobarbitalu, jego określenie jako pochodna pirymidyny jest zbyt ogólne, chemicznie

jest on heksahydropirymidyno-2,4,6-trionem, dodatkowo do wymienionych ugrupowań decydujących o działaniu barbituranów na OUN należy dodać fragment alkinyłowy, który występuje w strukturze metaheksitalu; s. 26, wśród działań niepożądanych kwasu walproinowego powinno uwzględnić się charakterystyczny i bardzo niebezpieczny efekt teratogeny leku; s. 27, zgodnie z nazewnictwem narzuconym przez FP, prawidłowa nazwa leku to lewetyracetam, a nie lewetiracetam (ten bardzo drobny błąd pojawia się w całej pracy i dotyczy również brywaracetamu na Ryc. 6., s. 30); s. 29, na Ryc. 5. brak modelu BLA, który pojawia się w opisie ryciny, ponadto sugerowałbym w miejsce określenia „model gamma-hydroksymaślanu” wprowadzić nieco bardziej precyzyjną nazwę – „model uogólnionych napadów typu nieświadomości indukowanych γ -hydroksy-maślanem”; s. 30, na Ryc. 6. nazwa „model rozniecania lamotryginą u szczurów” jest myląca, sugeruję modyfikację na „model opornych na lamotryginę drgawek rozniecanych z układu limbicznego jądra migdałowego”; s. 31, podział strukturalny kumaryn warto byłoby wzbogacić o ogólne wzory chemiczne.

- W części Materiały do badań, s. 40 wydaje się, że ilość myszy do oceny stężenia leków w homogenatach mózgu dla, kwasu walproinowego i lewetyracetamu oraz ich kombinacji z ksantotoksyną jest błędna i powinna wynosić 4 grupy po 8 myszy, co daje wartość 32, a nie 24; opis metody chromatograficznej na s. 44 powinien zostać uzupełniony o istotne informacje odnośnie stosowanego gradientu rozpuszczalników, tj. proporcji początkowej i końcowej użytych eluentów oraz czasu. Dodatkowo dyskusyjne jest zastosowanie jako fazy ruchomej roztworu formamidu, czy nie chodziło o octan amonu?; s. 48, w obliczeniach statystycznych warto doprecyzować jakim programem posługiwał się Doktorant, ponadto we fragmencie tym pominięto test t-Studenta, który pojawia się w kontekście późniejszej analizy danych.
- W sekcji Wyniki korzystnie byłoby zamieścić pod Ryc. 8, 9, 10 i 11 nazwę zastosowanej analizy statystycznej oraz jej rezultat, a także umieścić wartości średnich przy każdym słupku. Zabieg ten pozwoli na łatwiejszą analizę danych. Ponadto, błąd standardowy średniej (SEM) jest wielkością stosowaną rutynowo i nie ma potrzeby opisywania go w legendzie danej ryciny jako kreski pionowe lub poziome w przypadku Ryc. 12 i 13. Sugeruję również usunąć skróty leków, które widnieją na osi rzędnych Ryc. 8, 9, 10 i 11, a pozostawienie jedynie wielkości ED₅₀. W nagłówku Tabel 4-8 wydaje mi się logiczniejsze użycie stwierdzenia „aktywność przeciwdrgawkowa” zamiast „aktywność przeciwpadaczkowa”; s. 59, Tabela 8, stwierdzenie: „całkowita liczba zwierząt badanych, których oczekiwany efekt przeciwdrgawkowy mieścił się

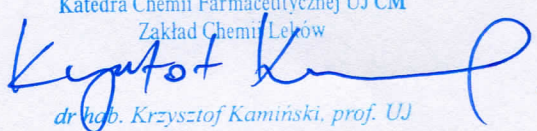
w zakresie od 16% do 84%”, znajdujące się w jej legendzie jest dla mnie niejasne i wymaga wyjaśnienia; na Ryc. 12 i 13 skrót HPLC powinien zostać zamieniony na poprawny tj. UHPLC; s. 65, w Tabeli 10 siła mięśniowa wyrażona została w jednostce gram-siła [gf], podczas gdy w Materiałach i metodach widnieje jako niutony; s. 68, w podpisie Ryc. 14 przez omyłkę znalazł się fenobarbital, dla którego nie badano działania neuroprotekcynowego.

- W części dotyczącej oceny stężenia badanych substancji w mózgach myszy, nasuwa się pytanie, czy przewidywane są testy farmakokinetyczne, które pozwolą na ocenę frakcji wolnej kwasu walproinowego podanego pojedynczo i w kombinacji z ksantotoksyną w osoczu. Wyniki takich badań umożliwiłyby bardziej precyzyjne określenie, na którym etapie farmakokinetyki dochodzi do interakcji leku z furanokumaryną. Wskazuje na to również sam Doktorant w dyskusji swojej rozprawy doktorskiej.
- Analiza piśmiennictwa ujawniła, iż kilka wymienionych pozycji nie posiada cytowań w tekście rozprawy, są to prace następujących autorów: Baker (1998), Hui Yin (2013), Kamiński (2004), Liang (2006), Pitkänen (2005). W przypadku pracy Schmidt’a i Löscher’a z 2005, w tekście pojawia się błędny rok 2011 (s. 22), natomiast praca Rigo i wsp. (2002) została przez pomyłkę cytowana dwa razy na s. 28.

Reasumując, pod względem merytorycznym i formalnym przedłożona do oceny praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom o stopień doktora, które określa 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 (tekst jednolity - Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), zatem wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej IMW w Lublinie, o jej przyjęcie i dopuszczenie Autora, Pana mgr Jarosława Ryszarda Bryda, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 11 listopada 2019

Uniwersytet Jagielloński-Collegium Medicum
Katedra Chemii Farmaceutycznej
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9
tel. 12 620-54-50, fax 12 620-54-50

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Chemii Leków

dr hab. Krzysztof Kamiński, prof. UJ