



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

dr hab. Paweł Wiczling
Zakład Biofarmacji i Farmakokinetiki
Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki
Al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk
e-mail: wiczlign@gumed.edu.pl, tel. 58-349-14-94

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Anny Glinki

pt.: „Wykorzystanie modeli matematycznych do oceny wpływu zmienności w populacji na efekt proarytmiczny i bezpieczeństwo stosowanie leków”

wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Sebastiana Polaka, kierownika Zakładu Farmacji Społecznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

Określenie stopnia i siły działania proarytmicznego, a w konsekwencji ryzyka wystąpienia arytmii, jest ważnym elementem oceny bezpieczeństwa farmakoterapii, zarówno dla nowopowstających, jak i będących w użyciu, leków. O istotności tego rodzaju badań naukowych przemawia duża liczba prac, sięgająca kilku tysięcy rocznie, publikowanych w czasopismach naukowych związanych z tą tematyką.

Głównym celem przedstawionej do recenzji pracy była ocena zmienności międzyosobniczej oraz ocena wpływu różnego rodzaju kowariant (parametrów) na potencjał powstawania zaburzeń elektrofizjologicznych komórek serca. Parametrami pomagającymi wyjaśnić różnice międzyosobnicze były wiek, płeć, stężenia elektrolitów w osoczu, rytm serca, genotyp, oraz różnice w farmakokinetyce leków. Rozumienie wpływu tych parametrów na obraz EKG (wyrażone poprzez odpowiedni model matematyczny) jest pomocne w tworzeniu wirtualnych badań, które z kolei pozwalają ocenić szanse uzyskania konkretnych wyników w rzeczywistych badaniach naukowych. Tego rodzaju podejście bazuje na przekonaniu, że poprzez integrację wielu podstawowych informacji związanych z fizjologią pacjenta np. dotyczącą farmakokinetyki leku i elektrofizjologii komórek kardiomiocytów,

możliwe jest przewidywanie efektu działania leku *in silico*, np. tylko w oparciu o strukturę chemiczną związku. Kluczowym elementem w tworzeniu takich modeli jest dokładne rozumienie i odpowiedni opis matematyczny wszystkich podstawowych procesów wpływających na końcowy efekt kardiologiczny. Oczywiście musi być to poprzedzone wyznaczeniem wszystkich parametrów takiego modelu, w oparciu o badania własne lub syntezę informacji zawartej w literaturze naukowej, oraz oceną przewidywań modelu dla różnego rodzaju problemów. Taki model może być również pomocny do symulacyjnej oceny hipotez badawczych. Wszystkie te aspekty, tzn. parametryzacja modelu, ocena jego właściwości predykcyjnych, oraz praktyczne jego wykorzystanie do tworzenia wirtualnych badań klinicznych, zostały poruszone w recenzowanej pracy.

Praca doktorska mgr Anny Glinki ma co raz częściej spotykany układ dla tego typu opracowań, który stanowi skrótowy opis prowadzonych badań wraz z załączonymi publikacjami naukowymi. Monografia zawarta jest na 97 stronach i składa się ze wstępu, celu pracy, metodyki oraz wyników i dyskusji. Praca rozpoczyna się streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów, a wieńczy ją podsumowanie, podziękowania, piśmiennictwo oraz pięć prac naukowych oryginalnych i jedna przeglądowa autorstwa lub współautorstwa p. mgr Anny Glinki. Dysertacja została udokumentowana licznymi rycinami i równaniami. Przypisy literaturowe zamknięte zostały w ilości 92, w zdecydowanej większości opublikowane po 2005 roku w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Pracę czyta się z dużą przyjemnością, napisana jest poprawnym językiem i zawiera niewiele potknięć redakcyjnych.

Wstęp pracy jest dobrze przedstawionym wprowadzeniem do zagadnień poruszanych w rozprawie doktorskiej. Z dużym zainteresowaniem przeczytałem poszczególne jego części, gdzie przejrzyste i w sposób możliwie zwięzły została opisana anatomia i fizjologia serca, wpływ różnych grup leków na EKG, techniki badań potencjałów czynnościowych oraz matematycznego modełu wykorzystywane do ich opisu.

Cel rozprawy doktorskiej został dobrze określony, natomiast jego osiągnięcie zostało szeroko opisane w metodologii, wynikach i dyskusji oraz w sześciu załączonych publikacjach pełnotekstowych.

Treści zawarte w **pierwszej pracy**, opublikowanej w *Toxicology Mechanism and Methods*, dotyczą wyznaczania zależności pomiędzy objętością i powierzchnią kardiomiocytów a wiekiem pacjentów oraz stworzeniem procedury pozwalającej generować

wielkość tych parametry w sposób odzwierciedlający ich rozkład w populacji ludzkiej. Taka informacja jest konieczna do uzyskiwania dokładniejszych przewidywań elektrofizjologii kardiomiocytów u pacjentów z różnych grup wiekowych.

W **drugiej publikacji** (*Bioinformation*) oceniono wpływ polimorfizmu K897T w genie hERG na obraz EKG. Ocena została oparta o wirtualny (symulacyjny) eksperyment, który pokazał, że u nosicieli tego rodzaju polimorfizmu można się spodziewać wydłużonego czasu 90% repolaryzacji kardiomiocytu.

Trzecia praca (*Bio-Algorithms and Med-Systems*) porównuje wpływ rzadkich mutacji w genie hERG na kształt potencjałów czynnościowych komórek lewej komory serca dla szerokiego zakresy częstotliwości pobudzenia oraz dla trzech typów miocytów.

W kolejnej **czwartej pracy** (*Computer in Biology and Medicine*) porównano eksperymentalnie otrzymane zmiany w parametrze QTc (skorygowany o rytm serca odstęp QT) występujące po podanie jednego z sześciu leków: haloperidolu, zypasydonu, kwetiapiny, olanzapiny, resperrydonu i tiorydazyny z wartościami symulowanymi przez zaproponowany przez autorkę model kardiomiocytu.

Piąta publikacja (*Toxicology Mechanism and Methods*) porównuje eksperymentalne wartości QTc u pacjentów, którym podano risperidon z wartościami symulowanymi w oparciu o matematyczny model kardiomiocytu. Szczególną uwagę w tej pracy zwrócono na wpływ polimorfizmu genów kodujących enzymy z grupy cytochromu CYP450 2D6 na efekt kardiologiczny.

Ostatnia, **szósta publikacja** (*Drug Discovery Today*) jest pracą przeglądową omawiającą ideę wykorzystywania technik modelowania i symulacji do oceny efektu proarytmicznego leków.

Lektura dysertacji uprawnia do stwierdzenia, że Autorka wykazała się dużą biegłością w opanowaniu zagadnień związanych z modelowaniem procesów biologicznych oraz ich praktycznym wykorzystaniem w rozwiązywaniu problemów spotykanych w badaniach nad oceną aktywności proarytmicznej leków.

Podjęta przez p. mgr Annę Glinkę tematyka wymagała opanowania różnych metod statystycznych, rozumienia fizjologii EKG, umiejętności planowania oraz konsekwentnej realizacji założonego planu. Zebrane prace dowodzą, że Doktorantka opanowała te

wymagania w stopniu bardzo dobrym. Przedstawione w poszczególnych pracach wyniki oraz ich dyskusja potwierdzają dojrzałość Autorki poprzez prezentację właściwej i równocześnie krytycznej oceny otrzymanych wyników. Praca ta dowodzi również dociekliwości Doktorantki, zrozumienia przez niej badanej materii oraz umiejętności stawiania i rozwiązywania problemów badawczych.

Strona redakcyjna pracy jest wykonana bardzo starannie, z obowiązku znalazłem zaledwie kilka potknięć i sformułowań wartych w mojej ocenie drobnej korekty.

1. w tytule pracy brak określenia o jakim rodzaju zmienności jest mowa, czy o zmienności wewnątrzosobniczej, międzypersonalnej, czy może między lekami, eksperymentami etc.
2. w abstrakcie zamiast sformułowania „sygnał fałszywie pozytywny”, lepiej użyć „wynik fałszywie pozytywny”
3. Str.9 – powinno być „retencją jonów w organizmie”
4. Str.10 – zdanie o trójcyklicznych lekach przeciwdepresyjnych nie jest zbyt udane.
5. Str.13 – w opisie ryciny 1 powinno być PR.
6. Str.14 – nie rozumiem zdania „Ponadto pozwalają one (badania przedkliniczne?) na ocenę farmakodynamiki leku, efektów wywoływanych przez metabolity czy redystrybucję (czego) do poszczególnych tkanek (dystrybucja to przemieszczanie się leku do tkanek. Redystrybucja to proces odwrotny).
7. Str.15 – nie rozumiem do czego odnosi się „z odpowiednio długim okresem wypłukania”.
8. Str.16 – Pierwszy paragraf ma zaburzoną chronologię zdarzeń.
9. Str.17 – „Blokuje 50% prądu” i „hamowanie prądu” są sformułowaniami potocznymi
10. Str.17 – zdanie „Kardiomiocyty hiPSC umożliwiają (...) po agonistów receptorów muskarynowych [63]” jest niezrozumiałe.
11. Str.19 – „Podstawy modelowania zostały oparte na opisie zjawisk biofizycznych badanych i analizowanych przez długi czas ...” – to zdanie nie do końca jest dla mnie jasne.
12. Str.20 – warto dodać jednostki w opisie parametrów poszczególnych równań.
13. Str.20 – opis pod ryciną 4 nie objaśnia wszystkich symboli zawartych na rysunku, np. Gto.
14. Str.30 – „Jedyne ograniczenie stanowi moc obliczeniowa” – jest to zbyt mocne stwierdzenie, np. ograniczeniem może być również dokładność przewidywań modelu.
15. Str.30 – „Efekt podania substancji leczniczej jest najczęściej naśladowany z wykorzystaniem wartości IC50”. Jest to niezbyt fortunne sformułowanie.
16. Str.32 – powinno być „w konsekwencji z jej polem powierzchni”.
17. Str.33 – „frakcja wolna leku” zamiast „frakcja czynna leku”.
18. Str.35 – powinno być „zgodnie z jego log-normalnym rozkładem”.

Jednym z nałożonych na recenzenta obowiązków jest zwrócenie uwagi na nieścisłości czy pewne niedociągnięcia, które dostrzeżone zostaną w przedstawionej pracy. Wywiązując się z tego obowiązku chciałam prosić o odniesienie się do następujących uwag.

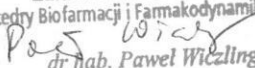
1. Kluczowym aspektem związanym z niemal każdym modelowaniem jest proces walidacji. Jest on szczególnie ważny kiedy proponowany model ma być użyty do symulacji np. w konstrukcji wirtualnych badań klinicznych. W jaki sposób walidowane są tak złożone modele?
2. W pracy I użyto średnich i to od różnej liczby pacjentów do wyznaczenia zależności pomiędzy objętością kardiomiocytu a wiekiem pacjenta. Taka sytuacja prowadzi do estymacji zaniżonych wartości zmienności międzyosobniczej (której oznaczenie było celem tej pracy). Zastanawia mnie jak duży wpływ na symulacje procesów elektrofizjologicznych kardiomiocytów mogło mieć niedoszacowanie tej zmienności?
3. W moim przekonaniu szczególnie trudne jest przewidywanie wartości IC_{50} odpowiadającej warunkom *in vivo* na podstawie pomiarów *in vitro*. Podobną trudność może stanowić wyznaczenie stężenia niezwiązanej frakcji leku w miejscu działania (biofазie). W jaki sposób te wartości były otrzymywane w Pani pracach? To pytanie częściowo odnosi się do wartości z tabeli 2 przedstawionej w publikacji nr 5. Dlaczego w tej tabeli stężenie niezwiązanej frakcji leku nie jest proporcjonalne do całkowitych stężeń leku w osoczu? Czy stężenie leku w tkance sercowej ($nM_{cardiac}$) odnosi się do frakcji całkowitej czy frakcji niezwiązanej leku? Jak zostało policzone? Dodatkowo w pacy IV nie uwzględniono współczynnika podziału tkanka serca/osocze do uzyskania stężeń leku w pobliżu kardiomiocytu. Taka korekta była natomiast zastosowana w przypadku risperidonu (praca VI). Z czego wynika ta rozbieżność?

Wymienione wyżej uwagi i pytania nie obniżają wysokiej oceny rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Anny Glinki, która stanowi opracowanie wartościowe z poznawczego i praktycznego punktu widzenia. Ponadto, Doktorantka jest współautorem sześciu prac o łącznym współczynniku oddziaływania 10,49. Moim zdaniem oceniana rozprawa doktorska świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu mgr Anny Glinki do prowadzenia badań naukowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja w pełni odpowiada warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim zawartym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. – *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dziennik Ustaw RP nr 65, poz. 595 z dnia 16 kwietnia 2003 r.) i wnoszę do

Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum o dopuszczenie mgr Anny Glinki do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Gdańsk, 30 października 2015 r.

Adiunkt
Zakładu Farmakokinetyki
Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki GUMe.

dr hab. Paweł Wiczling