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

dr hab. Zofia Rogóż
Zakład Farmakologii.
Instytut Farmakologii PAN
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
tel. (12) 662 32 79
e-mail: rogoz@if-pan.krakow.pl

OCENA

rozprawy doktorskiej pt. **„Ocena aktywności psychotropowej wybranych pochodnych indoloamin o multireceptorowym profilu działania"** wykonanej przez Panią **mgr Annę Wasik** na Wydziale Farmaceutycznym w Zakładzie Farmacji Klinicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. Anny Wesołowskiej oraz promotora pomocniczego Pana dr hab. Marcina Kołaczkowskiego, prof. UJ.

Schizofrenia to choroba ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Przyczyny zapadalności na to schorzenie są nieznane, choć zwraca się uwagę na jej podłoże genetyczne, czynniki środowiskowe, a także reakcje immunologiczne rozwijające się w odpowiedzi na zaistniały stan zapalny w obrębie OUN.

Przyjmuje się, że w ogólnej populacji społeczeństwa, średnio i wysoko rozwiniętych technologicznie, około 0.5 do 1.5% zapada na schizofrenię (dane WHO). Choroba ta dotyka z równą częstotliwością mężczyzn i kobiety, a szczyt zapadalności w przypadku płci męskiej przypada między 15 a 25 rokiem życia, natomiast u żeńskiej – okres ten opóźniony jest o około 10 lat.

W schizofrenii wyróżnia się trzy grupy objawów: (1) pozytywne (wytwórcze) takie jak halucynacje, iluzje, urojenia, niespójność myślenia i mowy, (2) negatywne (ubytkowe) takie jak zaburzenia mowy, brak motywacji, apatia, spłycenie afektu, niezdolność wyrażania emocji i odczuwania przyjemności (anhedonia), (3) kognitywne (poznawcze) zaburzenia płynności mowy, koncentracji, kojarzenia, myślenia abstrakcyjnego, funkcji wykonawczych, pamięci operacyjnej i związanej z rozpoznaniem. Objawy pozytywne pojawiają się najczęściej w ostrych fazach i stanowią najbardziej rozpoznawalny przejaw choroby. Jednak to objawy negatywne mogą być początkowo bagatelizowane, niezauważane, ale mają bardziej

upośledzający wpływ na funkcjonowanie w społeczeństwie oraz nie odpowiadają na farmakoterapię w przypadku stosowania klasycznych leków neuroleptycznych lub w ograniczonym zakresie na terapię atypowymi lekami przeciwpsychotycznymi.

U osób dotkniętych schizofrenią często obserwuje się obniżenie nastroju, któremu towarzyszy zobojętnienie, apatia i poczucie pustki wewnętrznej. Średni odsetek występowania depresji u tych pacjentów oszacowano na poziomie 25 do 50%. Współwystępowanie depresji u pacjentów schizofrenicznych wiąże się z gorszym rokowaniem powrotu do zdrowia oraz pełnego funkcjonowania w społeczeństwie, większym cierpieniem i prawdopodobieństwem nawrotu choroby w okresach remisji oraz zwiększonym ryzykiem samobójstwa, będącego przyczyną zgonu co dziesiątego chorego cierpiącego na schizofrenię.

Zaburzenia lękowe, obok zaburzeń nastroju, są najczęściej diagnozowane wśród pacjentów ze schizofrenią. Również współwystępowanie zaburzeń obsesyjno kompulsywnych (fobie społeczne, zespoły szoku pourazowego, napady paniki, agorafobie) u tych chorych jest dość dobrze udokumentowane. Co istotne z punktu widzenia klinicznego, doświadczany lęk u pacjentów schizofrenicznych wiąże się z gorszym rokowaniem, znacznie obniża jakość życia oraz zwiększa ryzyko zgonu na skutek aktu samobójczego.

Do terapii schizofrenii jako pierwsze leki wprowadzono typowe neuroleptyki (leki pierwszej generacji), do których zaliczamy chloropromazynę, haloperidol. Mechanizm ich działania przeciwpsychotycznego wynika z silnej blokady receptorów dopaminowych D_2. Leki te skutecznie znoszą objawy pozytywne schizofrenii, ale są nieskuteczne w łagodzeniu symptomów negatywnych. Ponadto dają szereg objawów niepożądanych z układu pozapiramidowego (np. polekowy zespół Parkinsona czy późne dyskinezy), co stało się podstawą poszukiwania nowych leków przeciwpsychotycznych pozbawionych tych efektów.

Atypowe leki przeciwdepresyjne (drugiej generacji) np. klozapina, risperidon, olanzapina kwetiapina z punktu widzenia klinicznego mają szersze spektrum działania. Są zwykle lepiej tolerowane niż klasyczne neuroleptyki. Leki tej grupy wykazują silne blokujące działanie w stosunku do receptorów 5-HT_{2A} niż do dopaminowych D_2. a także w testach na zwierzętach zwiększają poziom acetylocholiny w korze przedczołowej, stąd temu działaniu przypisuje się u części pacjentów, poprawę w zakresie objawów negatywnych i kognitywnych po ich zastosowaniu. Również w dawkach terapeutycznych obserwuje się zmniejszony potencjał wywoływania objawów niepożądanych z układu pozapiramidowego. Natomiast wysokie powinowactwo do receptorów histaminowych H_1 i serotoninergicznych 5-HT_{2C} jest związane z niekorzystnym wpływem na gospodarkę lipidowo-węglowodanową. Zaburzenia

metaboliczne (cukrzyca, hiperlipidemia, otyłość) stanowią poważny problem kliniczny (najpoważniejsze zaburzenia metaboliczne występują po olanzapinie).

Wprowadzenie do lecznictwa arypiprazolu, ze względu na jego odmienny mechanizm działania, rozpoczęło erę neuroleptyków trzeciej generacji, tzw. modulatorów dopaminowych. W przeciwieństwie do typowych neuroleptyków, które są antagonistami receptorów dopaminowych D_2, arypiprazol wykazuje aktywność częściowego agonisty wobec receptorów dopaminowych oraz nie powoduje silnej blokady receptorów dopaminowych D_2 w układzie pozapiramidowym, a ponadto jest antagonistą receptorów $5\text{-}HT_{2A}$ i częściowym agonistą w stosunku do receptorów $5\text{-}HT_{1A}$. W badaniach klinicznych stwierdzono, że arypiprazol nie wykazuje zaburzeń metabolicznych, a skutecznością dorównuje olanzapinie lub nawet ją przewyższa.

Aktualny stan wiedzy oraz dane zacytowane we wstępie pracy w pełni uzasadniają podjęcie przez Panią mgr Annę Wasik badań oceniających aktywność psychotropową wybranych pochodnych indoloamin o multireceptorowym profilu działania (zsyntetyzowanych przez zespół Pana dr hab. prof. UJ Marcina Kołaczkowskiego w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM). Celem badań była również próba wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za aktywność psychotropową badanych pochodnych. Jako związek odniesienia zastosowano arypiprazol, lek przeciwpsychotyczny trzeciej generacji o szerokim spektrum aktywności psychotropowej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opisana jest na 219 stronach, podzielonych na 11 rozdziałów, wyniki badań ***in vitro*** – badania radioreceptorowe, oznaczenie powinowactwa wobec wybranych receptorów oraz badania ***in vivo*** zaprezentowano w 127 tabelach i 103 rycinach, które wraz z 221 pozycjami aktualnego piśmiennictwa dają całościowy pogląd na aktualny stan badań w tym zakresie. Wstęp teoretyczny pracy (27 stron) stanowi kompendium wiedzy na temat biochemicznych podstaw funkcjonowania OUN ze szczególnym podkreśleniem zaburzeń obserwowanych w chorobach tego układu, takich jak schizofrenia, depresja czy lęk, a także współwystępowaniu wymienionych schorzeń i ich farmakoterapię. Ten szeroko zakrojony przegląd, zawierający umiejętnie dobrane dane, zaczerpnięte z ogromnej liczby informacji dostępnych w literaturze, został przedstawiony w sposób precyzyjny i prezentuje złożoność tej problematyki. Zakres merytoryczny, przedstawiony we Wstępie dobrze koresponduje ze sformułowanym Celem pracy, w którym

Doktorantka przedstawiła założenia i określiła zasadnicze cele swoich badań eksperymentalnych.

Do badań radioreceptorowych zsyntetyzowano 44 związki. Na podstawie wyników przesiewowego badania ***in vitro*** powinowactwa powyższych związków do wybranych receptorów (D_2, 5-HT_{2A}, 5-HT_6), do dalszych badań wybrano 7 związków (**ADN-1307, ADN-1319, ADN-1320, ADN-1321, ADN-1322, ADN-1346 i ADN-2013**), dla których wykonano pełne badania radioreceptorowe ***in vitro*** w celu oznaczenia powinowactwa względem receptorów; serotoninergicznego (5-HT_{1A}, 5-HT_7), dopaminergicznego (D_1, D_3, D_4), α-adrenergicznych (α_1, α_2) i białka transportującego 5-HT (*ang. serotonin transporter, SERT*), oraz profil funkcjonalny ***in vivo*** względem wybranych receptorów.

Przedstawione w rozprawie wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Badane związki pochodne indoloaminy charakteryzują się powinowactwem do receptorów monoaminergicznych takich jak: D_2, D_3, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_6), a niektóre także do 5-HT_7 i SERT.
2. Badane związki wykazują zbliżony profil funkcjonalny ***in vitro***, są to częściowi agoniści receptorów D_2 (oprócz ADN-1307), antagoniści receptorów 5-HT_{2A}, antagoniści receptorów 5-HT_6 (ADN-1319, ADN-1322, ADN-2013), częściowi agoniści (ADN-1320, ADN-1321, ADN-1322, ADN-2013) lub agoniści (ADN-1319, ADN-1336) receptorów 5-HT_{1A} oraz słabi antagoniści receptorów 5-HT_7 (ADN-1319, ADN-1336).
3. Badane związki w testach behawioralnych u myszy wykazują efekty charakterystyczne dla leków przeciwpsychotycznych oraz słabszy niż arypiprazol efekt uboczny na układ pozapiramidowy. Związki ADN-1319, ADN-1322 i ADN-2013 pozbawione są działania kataleptogennego do dawki 100 mg/kg. Natomiast ich działanie przeciwpsychotyczne może wynikać z aktywności częściowo-agonistycznej wobec receptorów D_2 i antagonistycznej wobec receptorów 5-HT_{2A}.
4. Związki ADN-1319, ADN-1336 i ADN-2013 wykazują efekty charakterystyczne dla leków przeciwdepresyjnych i przeciwlękowych u myszy, ponadto ADN-1319 i ADN-2013 wywołują takie działanie także u szczurów.

5. Działanie przeciwdepresyjne i przeciwlękowe związku ADN-1319 wydaje się być związane z jego multireceporowym profilem aktywności, tj. częściowe działanie agonistyczne w stosunku do receptorów D_2 i 5-HT_{1A} oraz działanie antagonistyczne w stosunku do receptorów 5-HT_6, 5-HT_7 i 5-HT_{2A}.
6. Mechanizm działania przeciwdepresyjnego związku ADN-2013 wydaje się być złożony i związany z bezpośrednim wpływem antagonistycznym wobec receptorów 5-HT_6 i pośrednio z aktywacją dopaminergiczną, w którą zaangażowane są przede wszystkim receptory D_1, chociaż w udział mechanizm tego działania nie można pominąć jego częściowo-agonistycznej aktywności wobec receptorów D_2 i antagonistycznej wobec receptorów 5-HT_{2A}.
7. Ponadto przeciwlękowe działanie związku ADN-2013 wydaje się być związane z jego preferencyjnym antagonizmem wobec receptorów 5-HT_6. Jednak na tym etapie badań nie można wykluczyć aktywności częściowo-agonistycznej wobec receptorów 5-HT_{1A}/D_2 oraz udziału innych receptorów monoaminergicznych.
8. Związek ADN-2013 i ADN-1319 potęgują działanie leków przeciwdepresyjnych (imipraminy, S-citalopramu moklobemidu, reboksetyny), a także działanie przeciwlękowe diazepamu i S-citalopramu, co może prowadzić do obniżenia dawek stosowanych leków, a w konsekwencji do ograniczenia działań niepożądanych oraz poprawę efektów terapeutycznych tych leków.
9. Związek ADN-2013 wykazał działanie anorektyczce, wynikające prawdopodobnie z jego aktywności antagonistycznej wobec receptorów 5-HT_6 i częściowo-agonistycznej wobec receptorów 5-HT_{1A} oraz braku działania mutagennego.
10. Związek ADN-2013 został wyselekcjonowany jako struktura wiodąca do dalszych badań skupiających się na poszukiwaniu leków skutecznych i bezpiecznych, mogących znaleźć zastosowanie w terapii behawioralnej i psychologicznej symptomów demencji.

Podsumowując, wyniki zawarte w rozprawie potwierdzają celowość badań farmakologicznych ***in vitro*** i ***in vivo*** związków pochodnych indoloamin o multireceptorowym profilu działania jako potencjalnych leków mogących znaleźć zastosowanie w terapii chorób psychicznych. Badania te wychodzą naprzeciw współczesnym kierunkom poszukiwań nowych, bardziej skutecznych i bezpiecznych leków przeciwpsychotycznych, gdyż obecnie dostępna farmakoterapia nie jest satysfakcjonująco efektywna ani bezpieczna.

Opis uzyskanych wyników, wzbogacony tabelami i rycinami, oraz sposób przeprowadzenia dyskusji, w konfrontacji z osiągnięciami innych badaczy, stanowi istotne osiągnięcie Autorki i pozwala na zaliczenie Jej do ekspertów w zakresie prowadzonych badań i zagadnień z nimi związanych. Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Wasik dowodzi bardzo dobrego opanowania szerokiego wachlarza modeli ***in vivo*** i ***in vitro*** stosowanych do oceny potencjalnego działania przeciwpsychotycznego, przeciwdepresyjnego i przeciwlękowego. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka wykazuje umiejętność współpracy z innymi zespołami badawczymi, co jest niezwykle ważne, szczególnie w pracach badawczych mających za zadanie wprowadzenie do terapii nowego leku.

Wysoko oceniam wartość merytoryczną zaplanowanych i zrealizowanych przez Doktorantkę badań farmakologicznych. Do obowiązku recenzenta należy jednak wskazanie niedociągnięć zawartych w rozprawie, są one natury redakcyjnej i w niczym nie umniejszają treści merytorycznej pracy *[pisownia - **1)** str. 42 i.p., str. 44 ip; **2)** str. 42 1% Tween 80, Tabele i opisy Rycin Tween 1%; **3)** MK-801, D-amfetamina oraz imipramina i S-citalopram podobnie jak reboksetyna dobrze rozpuszczalne są w 0.9% NaCl, dlatego wymienione związki należało rozpuścić w tym roztworze a nie w wodzie, **4)** str. 189, Wnioski/punlt 3, podany jest związek ADN-322, ma być 1322]*, którą uważam za ciekawą, uwzględniającą aktualną wiedzę, związaną z tak ważnym problemem jakim jest terapia schizofrenii, a zwłaszcza jej negatywnych i kognitywnych objawów. Wyniki opisane w pracy znacznie rozszerzają możliwości badawcze w poszukiwaniu nowych, skutecznych i bezpiecznych leków przeciwpsychotycznych.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Anny Wasik w pełni odpowiada wymogom sformułowanym w ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Wasik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kompleksowo zaplanowane i zrealizowane badania, ich wartość naukowa, istotna wartość metodologiczna pracy, wykraczająca ponad przeciętnie stosowane badania skriningowe. włożony wysiłek oraz zdobyte przez Doktorantkę umiejętności, **mogą być podstawą wyróżnienia pracy doktorskiej Pani mgr Anny Wasik.**

Zofia Rogóż
.....

Kraków, 03. 08. 2017

dr hab. Zofia Rogóż