

Prof. dr hab. Sylwia Fidecka  
emerytowany kierownik  
Katedry i Zakładu  
Farmakologii z Farmakodynamiką  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

## O C E N A

rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych

**"Ocena aktywności psychotropowej wybranych pochodnych indoloamin o multireceptorowym profilu działania"** wykonanej w Zakładzie Farmacji Klinicznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

przez mgr Annę WASIK

pod opieką prof. dr hab. Anny Wesołowskiej jako promotora i dr hab. Marcina Kołaczekowskiego prof. U jako promotora pomocniczego.

Schizofrenia, znana i opisywana już w starożytności, jest ciężką neurorozwojową chorobą psychiczną o bardzo zróżnicowanym przebiegu. Najczęściej dotyka ludzi młodych i jest uważana za schorzenie najbardziej wyniszczające mentalnie. Główne objawy schizofrenii obejmują symptomy pozytywne „wytwórcze” pod postacią urojeń, halucynacji, utraty poczucia rzeczywistości oraz „negatywne” jak anhedonia, apatia, chłód emocjonalny, dysforie. Objawom głównym często towarzyszy osłabienie procesów kognitywnych (pamięci i uczenia się). Nie bez znaczenia dla skuteczności terapii schizofrenii ma współwystępowanie lęków i objawów depresji. Współcześnie dostępne leki przeciwpsychotyczne są w stanie łagodzić objawy pozytywne, natomiast przeciwdziałanie objawom negatywnym i poznawczym stwarza liczne problemy. Dlatego też przebadanie 7 nowo zsyntetyzowanych pochodnych indoloaminy i „wyselekcjonowanie związku o multireceptorowym profilu działania, wykazującym oprócz aktywności przeciwpsychotycznej dodatkowe działanie przeciwdepresyjne, przeciwlękowe i/lub anorektyczne, w modelach zwierzęcych.” należy uznać za celowe, zarówno z naukowego jak i klinicznego punktu widzenia.

Przedłożona do oceny rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych jest monograficznym opracowaniem liczącym 219 numerowanych stron, w tym wykazy: piśmiennictwa (ponad 200 pozycji), tabel oraz rycin.

Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich (choć nie znalazłam zwykle dołączanego spisu skrótów) i składa się z „Wprowadzenia teoretycznego”, poprzedzonego spisem treści, „Celu pracy”, „Metodyki badań”, „Wyników”, „Dyskusji”, „Wniosków”, „Bibliografii”, „Streszczeń” w języku polskim i angielskim. Pracę otwiera strona z informacją o 2 artykułach, w których opublikowano część wyników recenzowanego projektu. Niestety w jednym z nich zabrakło wiersza z nazwiskiem doktorantki i innych współautorów (Siwek A., Jastrzębska- Więsek M., Partyka A., Wasik A., Wesołowska A., Mierzejewski).

Obszerne „Wprowadzenie teoretyczne”, liczące 27 stron, zostało podzielone na 5 części. W części pierwszej Autorka omawia badania epidemiologiczne i kryteria diagnostyczne rozpoznawania schizofrenii. Druga część zawiera opis klinicznych objawów choroby z wyraźnym uwypukleniem znaczenia objawów negatywnych, którym często towarzyszą zaburzenia poznawcze i depresje. Trzecią część Autorka poświęciła na omówienie zaburzeń afektywnych, głównie depresyjnych i lękowych, pojawiających się w schizofrenii. W czwartej części Doktorantka dokonuje przeglądu głównych teorii odnośnie przyczyn pojawiania się schizofrenii, w tym udziału genów odpowiedzialnych za wzrost ryzyka zachorowania, zaburzeń w funkcjonowaniu układu immunologicznego, zmian neurostrukturalnych oraz zaburzeń w neuroprzebieżności. Część czwarta zawiera opis grupy leków stosowanych w terapii schizofrenii z dokładnym omówieniem leków przeciwpsychotycznych: klasycznych (chlorpromazyna) i atypowych (arypiprazol) oraz leków przeciwlękowych, uspakajających i przeciwdepresyjnych. Na koniec Autorka prezentuje nowe kierunki poszukiwań farmakoterapii schizofrenii podkreślając wagę opracowywania leków przeciwpsychotycznych o wieloreceptorowym mechanizmie działania. Ten wstęp do dysertacji doktorskiej stanowi gruntowne, oparte na najnowszym światowym piśmiennictwie, wprowadzenie w tematykę pracy. Na tej podstawie mgr A. Wasik sformułowała, w pełni uzasadniony, cel pracy, przedstawiła kolejność postępowań oraz zakres prowadzonych badań.

W rozdziale „Metodyka badań”, na 13 stronach (w tym w 4 tabelach), Doktorantka zaprezentowała badane związki, substancje narzędziowe, oraz opisy procedur użytych do badań zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Badania behawioralne wykonano na samcach myszy szczepów Albino Swiss, C57BL/6J i CD-1 (zabrakło uzasadnienia wyboru tych szczepów do konkretnych badań) oraz szczurów szczepu Wistar. Brakuje informacji co było podstawą ustalenia zakresu dawek nowych związków do przeprowadzenia badań (np. dla ADN-1307 od 0.625 – 5.0 mg/kg a dla ADN-1321 od 2.5 – 40 mg/kg). Autorka nie wyjaśnia dlaczego rozpuszczalnikiem dla 8

substancji narzędziowych była woda, zazwyczaj przy podaniach parenteralnych związki podajemy rozpuszczone w soli fizjologicznej. Rozdział kończy „Analiza statystyczna wyników”, moim zdaniem potraktowana zbyt lakonicznie, co w konsekwencji utrudnia czytelnikowi odczytanie wyników.

Zastosowane procedury zostały zatwierdzone przez IV Lokalną Komisję Etyczną do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie oraz I Lokalną Komisję Etyczną do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie.

Opis sposobu przeprowadzenia doświadczeń behawioralnych zawarty w tej części dysertacji nie zawsze jest wystarczająco dokładny. Na przykład (str. 49) w omówieniu testu wymuszonego pływania u myszy zabrakło informacji, że został wykonany według „zaadaptowanej dla myszy” a nie „zgodnie” z procedurą opisaną przez Porsolta i wsp.1978” w oryginale dla szczurów. Przy opisie procedury uniesionego labiryntu krzyżowego (str.51) nie podano czasu na jaki zwierzęta były poddawane adaptacji w czarnym pojemniku.

Rozdział „Wyniki” obejmuje 114 stron pracy, a dokumentacja badań przedstawiona jest na 103 rycinach i w 127 tabelach. Autorka stwierdziła, między innymi, że w większości badane związki są częściowymi agonistami receptora D<sub>2</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> i antagonistami receptora 5-HT<sub>2A</sub>. Wyniki badań odnośnie powinowactwa i aktywności wewnętrznej badanych struktur wobec wybranych receptorów zamieszczono w tabelach 8, 9 i 10. Niestety tabela 8 jest niefortunnie podzielona (strony 55/56), a tabela 9 niekompletna – brak danych odnośnie częściowego agonizmu badanych związków wobec receptora D<sub>3</sub>, omawianego na str.56.

Opisy wyników badań części behawioralnej są lakoniczne i niekiedy przypominają wnioski. Dopiero umieszczenie rycin (nie w pełni ilustrujących wyniki) łącznie z tabelami, zawierającymi pełny zakres wyników umożliwia ich odczytywanie i zrozumienie. Przykładem jest brak, na ryc. 2 - 17, słupka przedstawiającego wartość kontroli podstawowej (Tween 1% + Woda), a oznaczenia statystycznej znamienności pod postacią gwiazdek (\*) odnoszą się właśnie do tej wartości, co jest podane w opisie pod każdą ryciną. Ponadto czytelnika może wprowadzać w błąd brak tego znakowania przy grupach Tween + amfetamina i Tween + MK-801 (ryc. 4-17).

W tej części opisu wyników Autorka, omawiając hamujący wpływ badanych połączeń na zwiększoną ruchliwość wywołaną podaniem D-amfetaminy i dizocylpiny (MK-801) stwierdza, że jest on słabszy i, w większości, mniej specyficzny od związku referencyjnego (arypiprazolu). Oceniając działanie kataleptogenne badanych struktur Doktorantka wykazała wyraźnie słabsze od arypiprazolu czy brak takiej aktywności po podaniu związków ADN-1319, ADN-1322 i ADN-2013. W tabelach (36 - 43) przedstawiono dane pod postacią cyfr ale brakuje informacji co

one przedstawiają. Czy są to średnie z 3 prób u 10 myszy w danym czasie, czy tylko średnie z wybranej próby i co przedstawiają (zapewne sekundy).

Powyższe wyniki umożliwiły wyselekcjonowanie 3 pochodnych, ADN-1319, ADN-1322 i ADN-2013, do szerszych badań, które ograniczyły liczbę pochodnych do dwóch - ADN-1319 i ADN-2013. Dla tych związków Doktorantka wykazała aktywność przeciwdepresyjną (stosując testy wymuszonego pływania u myszy i szczurów) oraz przeciwłękową (z zastosowaniem testu czterech płytek i zagrzebywania kulek u myszy oraz testu uniesionego labiryntu krzyżowego i konfliktu Vogla u szczurów). Kolejne badania, w tym ujawnienie działania anorektycznego, wykazane w teście pobierania pokarmu, i brak aktywności mutagennej (ocenianej *in vitro*), ostatecznie wskazały na ADN-2013 jako strukturę wiodącą w poszukiwaniu nowych leków o lepszym profilu terapeutycznym w leczeniu behawioralnych i psychologicznych objawów chorób psychicznych z towarzyszącą demencją.

W tej części pracy znalazłam najwięcej uchybień, wynikających zapewne z ogromu danych doświadczalnych. Poniżej kilka przykładów:

- brak oznakowania statystycznej znamienności (#) grupy prezentującej wyniki łącznego podania aripiprazolu i imipraminy w stosunku do grupy kontrolnej tween + imipramina (ryc. 37 i 38), co było przedstawione w tabeli 56,
- brak zgodności oznaczenia statystycznej znamienności (#####) na ryc. 47 z przedstawionym w opisie ryciny i w tabeli 63,
- brak opisu oznakowań, pod tabelą 67 i pod ryc. 52, statystycznej znamienności (\*\*, #) wpływu łącznego podania ADN-2013 z bupropionem vs odpowiednie grupy kontrolne,
- na ryc.66c zamieniono kolejność słupków ilustrujących wyniki aripiprazolu podanego w dawkach 0.5 i 1.0 mg/kg
- brak zgodności oznakowania statystycznej znamienności zaznaczonej na ryc.76 z opisem pod ryciną, w tabeli 108 i ryc. 80, na ryc.84 i 86 z odpowiednimi opisami pod rycinami, w tabelach 112 i 115 z odpowiednimi opisami, na ryc.87 i opisem pod ryciną,
- w pierwszym zdaniu opisu działania związku ADN-1319 w teście Vogla u szczurów należy poprawić „istotnie redukował” na „istotnie zwiększał” liczbę notowanych parametrów, co jest przedstawione w dalszej części opisu, w tabeli 128 i na rycinie 98,
- brak zgodności danych w tabeli 132 z prezentowanymi na ryc. 101b oraz umieszczenie na rycinie wyników związku ADN-1319, które nie są omawiane i brak ich w tabeli, co wprowadza dodatkowe zamieszanie.
- brak zgodności oznakowania statystycznej znamienności zaznaczonej na ryc.103 z

opisem pod ryciną ( $p < 0.0001$  to 3 czy 4 gwiazdki?)

Podsumowując, konieczne jest ujednolicenie oznakowania statystycznej istotności otrzymanych wyników, ponadto sugerowałabym ograniczenie oznakowania do 4 znaków (np. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ), ponieważ powstały chaos utrudnia czytelnikowi orientację w tych danych. (np. tab.108 i ryc.80)

Opisana powyżej, w wielkim skrócie, doświadczalna część pracy doktorskiej mgr Anny Wasik, mimo wielu uwag, zdecydowanie zasługuje na pozytywną opinię. Autorka wykonała obszerne badania z zastosowaniem właściwie dobranych metod, co zaowocowało ogromną pulą danych. Należy podkreślić, że użyte metody wymagają dobrego opanowania warsztatu badawczego, dokładności i cierpliwości. Biorąc to pod uwagę, powyższa pozytywna ocena jest całkowicie uzasadniona.

W obszernej, wyczerpującej i interesująco napisanej „Dyskusji” Doktorantka omówiła wyniki swoich badań *in vitro* i *in vivo* oraz przedstawiła dane z najnowszego światowego piśmiennictwa. Ta część pracy została podzielona na 4 podrozdziały (poświęcone profilowi funkcjonalnemu, aktywności przeciwpsychotycznej, przeciwdepresyjnej i przeciwłękowej badanych pochodnych), co bardzo ułatwia czytelnikowi ogarnięcie ogromu zawartych tu danych. Autorka podsumowując działanie przeciwpsychotyczne badanych struktur chemicznych stwierdza, że jest ono słabsze i niespecyficzne w porównaniu do związku referencyjnego – arypiprazolu. Aktywność ta może wynikać z ich wpływu częściowo agonistycznego na receptor D<sub>2</sub> i antagonistycznego na receptor 5-HT<sub>2A</sub>. Wykazała też, między innymi, że chociaż mechanizmy przeciwdepresyjnej i przeciwłękowej aktywności ADN-2013, związku wyselekcjonowanego z grupy 7 badanych, są złożone, wydają się jednak być bezpośrednio związane z jego antagonistycznym wpływem na receptor 5-HT<sub>6</sub>. Także działanie anorektyczne ADN-2013 może być wynikiem blokady receptora 5-HT<sub>6</sub> ale też częściowo agonistycznego wpływu na receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

Muszę też zwrócić uwagę na drobne niezgodności, które znalazłam w tej części dysertacji. Tłumacząc rozbieżności własnych wyników z danymi Sarkisyan'a i Hedlund'a 2010 (str. 174) Autorka wskazuje na różnice w szczepach myszy wykorzystywanych do badań w testach „wymuszonego pływania” i „zawieszenia ogona” przez powyższych autorów (tj. C57BL/6J) i w niniejszej pracy (Albino Swiss). Istotnie, w teście „wymuszonego pływania” wykorzystywano różne szczepy ale test „zawieszenia za ogon” był wykonywany z użyciem tego samego szczepu tj. C57BL/6J. Opisując (str.170) wiązanie badanych związków z białkiem transportującym serotoninę (SERT) stwierdza, że ADN-2013 wykazuje niskie powinowactwo względem SERT, a

w następnym wierszu, że nie wiąże się z SERT. Podczas przygotowywania wyników do publikacji proponowałabym skorygować te rozbieżności.

Na zakończenie Autorka podsumowuje wyniki swoich badań w 10 poprawnie sformułowanych wnioskach. Prace kończy zwarte, dobrze napisane streszczenie w j.polskim i j. angielskim.

Z obowiązku Recenzenta muszę dodatkowo wspomnieć o konieczności uporządkowania Bibliografii (na kilka pozycji Autorka powołuje się w pracy ale brak ich w bibliografii, kilka pozycji jest w spisie ale wydają się zbędne, 3 pozycje są powtórzone dwukrotnie, a w tekście oznaczone literami a i b), ujednolicenia nazewnictwa (np. serotoninowy - serotoninergiczny, DSM-5 - DSM-V ) i poprawienia błędów literowych czy przestawień (np. SB-724457 – SB-742457, breksiprazol – breksipiprazol itp.). Uzyskane wyniki będą zapewne publikowane, a ponieważ warunki redakcyjne są zazwyczaj rygorystyczne warto przestrzegać określonych zasad przy redagowaniu pracy.

Po dokładnym zapoznaniu się z całością dysertacji autorstwa mgr Anny Wasik muszę podkreślić duży wkład pracy Doktorantki w przeprowadzenie trudnych i pracochłonnych badań, których wykonanie wymagało opanowania różnorodnych technik. Szerokie i ambitne cele, założone do realizacji w ramach rozprawy doktorskiej, zostały zrealizowane, a uzyskane wyniki są oryginalne i nowatorskie. Rozprawę doktorską, mimo licznych uwag, które nie mają jednak charakteru merytorycznego a głównie porządkowy, oceniam jednoznacznie pozytywnie.

Stwierdzam, że przedłożona praca odpowiada warunkom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk i **mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Anny Wasik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



*prof. dr hab. Sylwia Fidecka*

Lublin, 17 sierpnia 2017.