



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Farmakologii Klinicznej

Prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska

Wrocław, 08.08.2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr farm. Magdaleny Skubiszewskiej
pt. „Badania wybranych związków o potencjalnym działaniu farmakologicznym
w zaburzeniach funkcjonowania układu nerwowego”
uczestniczki studiów doktoranckich Collegium Medicum w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu,
wykonanej pod kierunkiem Promotora dr hab. n. farm. Alicji Nowaczyk, prof. UMK
i Promotora pomocniczego dr n. farm. Łukasza Fijałkowskiego

Podstawę opracowania recenzji stanowi Uchwała Nr 54/2022 Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z dnia 17 maja 2022 r., pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne – Prof. dr hab. Michała Marszałła z dnia 31.05.2022 r. oraz przekazana rozprawa doktorska.

Ocena wyboru tematu

Analiza bezpieczeństwa stosowania produktów leczniczych oraz ocena ich skuteczności stanowią niezbędne elementy procesu oceny technologii medycznych (ang. *health technology assessment*, HTA), który w istotny sposób wpływa na podejmowanie opartych na dowodach naukowych decyzji w zakresie polityki zdrowotnej, jak również sprzyja dobru pacjentów. Zapewnia im bezpieczeństwo terapeutyczne, uzyskanie odpowiednich efektów o największej wartości przy jednocześnie optymalnym wykorzystaniu dostępnych środków przeznaczonych na opiekę zdrowotną. Każdy lek zanim zostanie wprowadzony na rynek musi przejść przez wieloetapowy, rygorystyczny i kompleksowy proces identyfikacji działań toksycznych. Pomimo jednak restrykcyjnych regulacji i procedur, postępowanie to nie świadczy o braku zagrożenia farmakoterapii u wszystkich pacjentów. Leki są wycofywane z obrotu z powodu różnych działań niepożądanych, takich jak m.in. wydłużenie odstępu QT i wywoływanie arytmii *torsade de pointes* (TdP). W 2005 r. zostały opracowane przez Międzynarodową Radę Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi

(ang. *International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) dwa zbiory wytycznych dotyczących oceny ryzyka działania proarytmicznego. Uwzględniają one zależność między wydłużeniem odstępu QT w zapisie elektrokardiograficznym a ryzykiem wystąpienia arytmii typu TdP. Większość przypadków wydłużenia odstępu QT można powiązać z hamowaniem kodowanego genem hERG (ang. *human ether-a-go-go-related gene*) kanału potasowego (Kv11.1) w komórkach mięśnia sercowego. Przyjęto pewne progowe wartości odstępu QT (długość skorygowanego o rytm serca odstępu QT powyżej 500 ms) lub jego zmianę w porównaniu z wartością wyjściową (>60 ms), które z powodu ryzyka arytmii obligują do przerwania stosowania leku lub zmniejszenia dawki zarówno w badaniach klinicznych, jak i farmakoterapii. Wykazano jednak, iż są leki należące do silnych inhibitorów wymienionego kanału a jednocześnie pozbawione niebezpieczeństwa wywoływania arytmii np. werapamil i odwrotnie słaby inhibitor np. sotalol odpowiada za występowanie istotnych zaburzeń elektrofizjologii kardiomiocytów. Może to świadczyć o niewystarczającej specyficzności testów opartych o ocenę potencjału blokowania kanału. Tego rodzaju obserwacje były przyczyną podjęcia inicjatywy o nazwie Comprehensive In vitro Proarrhythmia Assay (CiPA), której celem jest modyfikacja, modernizacja i standaryzacja oceny bezpieczeństwa kardiologicznego leków, łączącej pomiary i ocenę następstw ich interakcji z różnymi kanałami jonowymi, zarówno w warunkach *in silico*, jak i *in vitro*. Należy przy tym pamiętać, iż kompleksowa i wiarygodna ocena potencjału proarytmicznego leku wymaga uwzględnienia wielu różnorodnych czynników związanych z lekiem oraz pacjentem m.in. interakcji między lekami.

W obliczu wzrastającej liczby różnorodnych zaburzeń czynności ośrodkowego układu nerwowego szczególnie ważne jest nie tylko poszukiwanie nowych produktów leczniczych, ale również podjęcie trudu wyjaśnienia dotąd nie w pełni poznanych mechanizmów działania znanych leków, stosowanych w praktyce klinicznej oraz oceny ryzyka ich toksyczności. Doktoranta zmierzyła się z takim wyzwaniem, objęła badaniami paroksetynę - selektywny inhibitor wychwyty zwrotnego serotoniny oraz tiagabinę - silny oraz wybiórczy inhibitor wychwyty kwasu γ -aminomasłowego (GABA) przez neurony i komórki gleju. W przypadku pierwszego produktu leczniczego oceniała jego interakcje z wybranymi celami terapeutycznymi, natomiast w odniesieniu do drugiego przeprowadziła analizę kardiotoxyczności, stanowiącej następstwo interakcji leku z kanałami jonowymi serca.

Tematyka badań Pani mgr Magdaleny Skubiszewskiej jest oryginalna, nowatorska i aktualna. Uzyskane wyniki dzięki obserwacjom, przeprowadzonym pod kierunkiem doświadczonego Promotora, są istotne nie tylko z punktu widzenia poznawczego, ale również ze względu na ich potencjalny charakter aplikacyjny.

Ocena strony formalnej rozprawy

Rozprawa Pani mgr Magdaleny Skubiszewskiej została przygotowana jako spójny tematycznie cykl czterech publikacji, które ukazały się drukiem w latach 2020-2021 w języku angielskim w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Ich sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) wynosi 22.180, a punktacja MNiSW 560.000. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Ma ona typowy dla takich prac doktorskich układ rozdziałów stanowiących logiczną całość – zawiera wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora, słowa kluczowe, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie i cel pracy, omówienie prac wchodzących w skład cyklu, kopie publikacji składających się na rozprawę doktorską, wnioski płynące z wykonanych badań, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, informację o źródłach współfinansowania badań wykonanych w ramach cyklu prac prezentowanych w pracy doktorskiej, wykaz rycin i tabel, oświadczenia współautorów, w których opisowo przedstawiono udział każdej z osób w powstawaniu poszczególnych publikacji. Z informacji zawartej w oświadczeniach współautorów publikacji oraz informacji przygotowanych przez Doktorantkę wynika, że Pani mgr Magdalena Skubiszewska odegrała istotną rolę w przygotowaniu koncepcji oraz projektu badań, zebraniu oraz analizie danych farmakologicznych, prowadzeniu badań *in silico*, analizie i interpretacji ich wyników oraz redagowaniu wniosków, jak również współredagowaniu manuskryptu. W pracy został umieszczony także dorobek naukowy Kandydatki o sumarycznym współczynniku wpływu 36.32 oraz punktacji MNiSW 979.00.

Spis 107 pozycji piśmiennictwa został zaprezentowany zgodnie z kolejnością cytowania w tekście, obejmuje prace, które ukazały się w latach 1995-2022. Jego redakcja jest jednolita i bez większych błędów.

Uwagi odnoszące się do opracowania pracy doktorskiej obejmują: w przypadku piśmiennictwa - brak wykorzystania najnowszego wydania monografii (pozycja 5), nieuwzględnienie stron publikacji od-do (pozycja 34 - 411-425, pozycja 39 - 463), niewłaściwa pisownia poszczególnych składowych tytułu czasopisma (pozycje 33, 39

należało użyć dużych liter). Ponadto, brak podania pozycji piśmiennictwa odnoszących się do poszczególnych rycin. Na stronie 14 umieszczenie niewłaściwej definicji niepożądanego działania leku. Obecnie obowiązująca według ustawy Prawo farmaceutyczne (Dz.U. 2021, poz. 1977) brzmi „działaniem niepożądanym produktu leczniczego - jest każde niekorzystne i niezamierzone działanie produktu leczniczego”.

Ocena merytoryczna

Pani mgr Magdalena Skubiszewska wprowadzając czytelnika w istotę swoich obserwacji przedstawiła w pracy pogładowej pt. „Kv11.1, Nav1.5, and Cav1.2 Transporter Proteins as antitarget for Drug Cardiotoxicity”, która ukazała się w 2020 r. w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, zagadnienia związane z rozwojem farmakologii bezpieczeństwa, uwzględniając trudności określenia profilu bezpieczeństwa leków. Scharakteryzowała pojęcia celu terapeutycznego i antycelu. Opisała kanały jonowe, w tym kanały potasowe, wapniowe i sodowe bramkowane napięciem. Omówiła trzy metody badań – testy z wykorzystaniem technik obliczeniowych – *in silico*, testy z wykorzystaniem technik pozaustrojowych – *in vitro* oraz *ex vivo*, jak również testy na żywych organizmach – *in vivo*, których zintegrowane wyniki są istotne dla określenia właściwości, mechanizmów działania oraz oceny bezpieczeństwa stosowania leków. Wyjaśniła czym jest modelowanie molekularne, w jaki sposób wykorzystuje się je w procesie poszukiwania nowych leków, prezentując proces dokowania ligandów i zaznaczając, iż w swoich badaniach użyła metod stochastycznych (algorytmu genetycznego), a proces dokowania ligand-białko przeprowadzono korzystając z oprogramowania AutoDock i AutoDockTools, co pozwoliło na uzyskanie połączeń o najmniejszej wartości energii. Zaprezentowała też opracowane w 2013 r. wytyczne oceny kardiotoksyczności leków - *Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay* (CiPA) stanowiące propozycję badań przesiewowych w zakresie bezpieczeństwa, zastępujące strategię regulacyjną z 2005 r. zalecaną przez Międzynarodową Konferencję Harmonizacji S7B.

Zarówno praca, jak i jej opracowanie napisane są w sposób rzeczowy, stanowiąc dobre wprowadzenie do dalszej części rozprawy. Po ich przeczytaniu, czytelnik nie ma wątpliwości, co do zasadności podjętych badań, których wyniki zawiera pełnotekstowa praca oryginalna pt. „Antiepileptic Drug Tiagabine Does Not Directly Target Key Cardian Ion Channels Kv11.1, Nav1.5 and Cav1.2” opublikowana w 2021 r. w czasopiśmie

Molecules. Autorka przedstawiła w niej wyniki oceny możliwości wywoływania tachykardii związanej z interakcją tiagabiny i związków referencyjnych (terfenadyny, batrachotoksyny, nifedypiny) z modelami ludzkich kanałów jonowych serca. W badaniach posługiwała się szacowaniem energii wiązania badanej cząsteczki w modelu ludzkich kanałów – hKv11.1, hNav1.5 i hCav1.5. Na uwagę zasługują obserwacje Doktorantki, oparte o metody dokowania molekularnego *in silico* i badania farmakologiczne przeprowadzone u szczurów, które umożliwiły weryfikację założeń CiPA dotyczących blokowania kanałów jonowych jako przyczyny tachykardii obserwowanej u pacjentów leczonych tiagabiną. Co ważne, Pani mgr Magdalena Skubiszewska wskazała na ograniczenia zastosowanego modelu farmakologicznego, mające swoje źródło w zróżnicowanej aktywności miocytów serca u gryzoni i człowieka. Badania *in silico* zostały przeprowadzone w Katedrze Chemii Organicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Badania farmakologiczne wykonano w Katedrze Farmakologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Preludium do przedstawienia oryginalnych wyników badań dotyczących paroksetyny stanowił obszerny artykuł przeglądowy pt. „Paroxetine – overview of the molecular mechanisms of action”, który ukazał się w 2020 r. w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*. Doktorantka scharakteryzowała w nim bardzo dokładnie właściwości paroksetyny w aspekcie interakcji z kilkoma celami molekularnymi, co jednocześnie pozwoliło na ich powiązanie z celami terapeutycznymi leku i umożliwiło wyjaśnienie przyczyny jego działań niepożądanych. Interesujące są dane wskazujące na możliwość reopozycjonowania paroksetyny w grupie młodych pacjentów.

W pracy oryginalnej pt. „Assessment of Paroxetine Molecular Interactions with Selected Monoamine and γ -Aminobutyric Acid Transporters” pochodzącej z 2021 r., opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences* Pani mgr Magdalena Skubiszewska podjęła próbę wyjaśnienia neurogenego mechanizmu działania paroksetyny. Posługując się metodami *in silico*, oferującymi większą wydajność skryningu cząsteczek, zweryfikowanymi następnie badaniami farmakologicznymi, przeanalizowała jej interakcje z ludzkimi modelami transporterów monoamin (ang. *monoamine transporters*, MATs): transporterów norepinefryny (hNET), serotoniny (hSERT), dopaminy (hDAT) oraz transporterami kwasu γ -aminomasłowego (hGATs) - hGAT1-3 i hBGT1. Badania *in silico* zostały przeprowadzone w Katedrze Chemii Organicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Wyniki badań otrzymane metodami obliczeniowymi zostały zwalidowane farmakologicznie we

współpracy z Katedrą Projektowania Leków i Farmakologii, na Wydziale Zdrowia i Nauk Medycznych Uniwersytetu w Kopenhadze.

W przedstawionej do oceny dysertacji doktorskiej Doktorantka udowodniła, iż posiada wymaganą od kandydata na stopień doktora nauk farmaceutycznych wiedzę związaną z przedmiotem badań własnych. Oceniając część doświadczalną rozprawy uważam, że Pani mgr Magdalena Skubiszewska wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem do podjętych zadań, wybrane metody i narzędzia były właściwe, co pozwoliło na realizację zaplanowanego zakresu badań. Świadczy to o dojrzałości naukowej i dobrej organizacji pracy.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji Doktorantka sformułowała wnioski zgodne z celami pracy i uzyskanymi wynikami, które wskazały m.in. na brak związku między częstoskurczem indukowanym stosowaniem tiagabiny a jej interakcją z kanałami jonowymi bramkowanymi napięciem. W przypadku paroksetyny okazało się, że oddziałuje ona silnie z transporterami monoamin oraz powoduje interakcje z transporterami GABA. Za neurogenny mechanizm jej działania odpowiadają głównie interakcje leku z transporterami serotoniny. Obserwowana interakcja paroksetyny z transporterami kwasu γ -aminomasłowego stanowi podstawę poszukiwania nowych pochodnych leku macierzystego charakteryzujących się zdolnością indukcji neurogenezy. Niewątpliwie świadczą one o kompetencjach Kandydatki oraz umiejętności rozwiązywania trudnych problemów badawczych. Dostarczają cennych informacji i wskazówek do prowadzenia dalszych badań, które mogą przyczynić się do optymalizacji wykorzystania w terapii tiagabiny i paroksetyny.

Podsumowanie

Stwierdzam, że wyniki pracy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Skubiszewskiej są wartościowe merytorycznie, zawierają niewątpliwy element nowatorstwa i stanowią rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego. Na podkreślenie zasługuje fakt logicznego zaplanowania zestawu doświadczeń, które pozwoliły zweryfikować postawione hipotezy badawcze. Cele założone na wstępie pracy były konsekwentnie realizowane i w mojej ocenie zostały osiągnięte. Przyjęto poprawną metodykę i przeprowadzono właściwą analizę wyników. Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia pracy badawczej oraz rozwiązywania problemów naukowych. Całość opracowania wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w reprezentowanej dziedzinie naukowej.

Podkreślana przez nią możliwość i konieczność prowadzenia dalszych badań celem głębszego wyjaśnienia postawionych zadań badawczych świadczy o kreatywności.

Podsumowując, uważam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska, której autorką jest Pani mgr Magdalena Skubiszewska spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Dlatego stawiam wniosek o przyjęcie i dopuszczenie przez Wysoką Radę Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu Pani mgr Magdaleny Skubiszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie uwzględniając wartości praktyczne i poznawcze przedstawionych badań wnoszę o jej wyróżnienie.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
FARMAKOLOGII KLINICZNEJ
kierownik
prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska