

Dr hab. n. farm. Anna Rapacz
Katedra i Zakład Farmakodynamiki
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków
tel. 012 620 55 30
e-mail: a.rapacz@uj.edu.pl

Kraków, 27.03.2019r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Krupy-Burtnik

pt. „Wpływ zonisamidu na wybrane ośrodkowe efekty działania etanolu stosowanego długotrwale w zwierzęcych modelach eksperymentalnych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Farmakodynamiki Katedry Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem dr hab. n. farm. prof. nadzw. Bogusławy Pietrzak oraz dr n. farm. Ewy Zwierzyńskiej pełniącej rolę promotora pomocniczego.

Rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Krupy-Burtnik podejmuje bardzo ważną i aktualną tematykę związaną z poszukiwaniem nowych możliwości farmakoterapii uzależnienia od alkoholu. Uzależnienie od alkoholu jest zaburzeniem psychicznym, którego podstawowym objawem jest koncentracja na spożywaniu tej używki i ciągła lub wciąż nawracająca potrzeba picia. Zjawiskiem powszechnym w tej grupie chorych jest wytwarzanie mechanizmów obronnych, czasami zwanych „systemem iluzji i zaprzeczeń”. Z tego też powodu znaczna część uzależnionych zaprzecza lub minimalizuje duże spożycie alkoholu oraz problemy zdrowotne i zaburzenia funkcjonowania społecznego spowodowane nadmiernym piciem. Leczenie uzależnienia od alkoholu jest procesem żmudnym wymagającym wielopłaszczyznowej terapii, obejmującej psychoterapię, socjoterapię i farmakoterapię, której głównym celem jest wydłużenie okresu abstynencji, a także złagodzenie objawów zespołu abstynencyjnego. W celu zmniejszenia objawów abstynencyjnych, takich jak bezsenność, zaburzenia lękowe, drgawki abstynencyjne oraz majaczenie alkoholowe, jako leki z wyboru stosowane są benzodiazepiny, najczęściej diazepam. Zgodnie z obowiązującymi obecnie założeniami terapii osób uzależnionych bezpieczny powrót do picia kontrolowanego nie jest możliwy, zatem osoby leczące się

powinny utrzymywać stały kontakt z placówkami leczniczymi i dążyć do utrzymania dożywotniej abstynencji. Mimo licznych badań prowadzonych w kierunku leczenia uzależnienia zatwierdzonych zostało jedynie kilka leków, w tym disulfiram, akamprozat, naltrekson i nalmefen. Poszukiwanie nowych możliwości poprawy farmakoterapii uzależnienia od alkoholu prowadzone jest obecnie także w grupie leków przeciwpadaczkowych (dotyczą m.in. topiramatu, lewetyracetamu, tiagabiny, gabapentyny, retygabiny i zonisamidu). Ten właśnie trud badawczy został podjęty przez mgr Agatę Krupę-Burtnik w ramach jej pracy doktorskiej.

Całość przedstawionego do oceny jednolitego opracowania obejmuje 145 stron i ma charakter typowy dla tego typu prac. Składa się z: wykazu stosowanych skrótów, części teoretycznej, opisu celu pracy, części doświadczalnej (obejmującej opis materiałów i metod wykorzystanych w realizacji badań oraz uzyskanych wyników), omówienia wyników i dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwa. Dodatkowo na ostatnich stronach opracowania zamieszczono informację o dorobku naukowym Doktorantki, który obejmuje dwie publikacje oryginalne i dwie przeglądowe tematycznie związane z rozprawą doktorską o łącznym współczynniku oddziaływania *impact factor* 5,257 i 77 punktach MNiSW oraz pozostałe prace (cztery) o łącznym współczynniku oddziaływania *impact factor* 6,796 i 88 punktach MNiSW (łącznie IF = 12,053, MNiSW = 165).

Części teoretyczna pracy, licząca 34 strony, zawiera pięć podrozdziałów, które dotyczą następujących zagadnień:

- *Charakterystyka farmakologiczna zonisamidu;*
- *Pozycja kliniczna zonisamidu;*
- *Próby innych zastosowań zonisamidu;*
- *Leki przeciwpadaczkowe nowej generacji a terapia uzależnień;*
- *Rola hipokampa i procesów pamięciowych w rozwoju uzależnienia.*

W tej części pracy Doktorantka wykazała się aktualną wiedzą dotyczącą wyżej wymienionych zagadnień. Szerokie ich omówienie, przygotowane bardzo starannie, doskonale uzasadnia zakres prac realizowanych przez Doktorantkę i stanowi bardzo dobre wprowadzenie w podjętą tematykę badawczą. Potwierdzeniem wysokiego poziomu tego fragmentu dysertacji doktorskiej jest fakt, jak wyżej wspomniano, iż Doktorantka jest pierwszym autorem już opublikowanych dwóch prac poglądowych dotyczących zonisamidu.

Jako **cel pracy** Doktorantka wyznaczyła sobie ocenę wpływu zonisamidu na wybrane ośrodkowe efekty działania etanolu stosowanego długotrwale w zwierzęcych modelach eksperymentalnych. Realizację postawionego celu przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszym zbadano wpływ zonisamidu na czynność bioelektryczną wybranych struktur mózgowych królików poddanych alkoholizowaniu. Posłużono się w tym celu metodą farmako-EEG opartą na analizie ilościowej zapisów EEG rejestrowanych z układu siatkowatego śródmózgowia, hipokampa i kory czołowej u królików, którym wcześniej zaimplantowano elektrody do tych struktur. Zapisów dokonano po każdym tygodniu podawania etanolu oraz po pierwszym i drugim tygodniu abstynencji. Z kolei, w drugim etapie badań dokonano oceny wpływu zonisamidu na procesy pamięciowe u szczurów otrzymujących długotrwale etanol oraz w fazach ostrej i późnej abstynencji.

Najbardziej obszerna **część doświadczalna** pracy, licząca 64 strony obejmuje podrozdziały: *Materiały i metodyka*, *Analiza statystyczna* oraz *Wyniki*. Metodyka badań przedstawiona jest na 25 stronach i zawiera oprócz szczegółowego opisu eksperymentów, ogólny schemat projektu badawczego, a także 11 rycin oraz 5 tabeli, które pozwalają na szybki wgląd w procedury badawcze. W tej części znajduje się informacja o liczbie i pochodzeniu zwierząt wykorzystanych w procedurach badawczych, warunkach ich bytowania oraz miejscu wykonania badań (Zwierzętarnia Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi). W podrozdziale *Analiza statystyczna* zaprezentowano testy, które wykorzystano w celu interpretacji wyników eksperymentów. W mojej ocenie, dobór gatunku zwierząt do konkretnych eksperymentów, zastosowane metody oraz sposób przeprowadzenia badań są w pełni poprawne i nie budzą zastrzeżeń.

Wyniki wykonanych badań Doktorantka opisała na 38 stronach pracy i przedstawiła w postaci 44 rycin. Mimo imponującej ilości uzyskanych danych Autorka logicznie je pogrupowała i dokładnie omówiła. Ponadto, wszystkie ryciny zostały czytelnie opisane. W pierwszym podrozdziale zaprezentowane zostały wyniki badania farmako-EEG. Ze względu na ich dużą liczbę, w pracy omówiono zapisy EEG uzyskane po 2., 4. oraz 6. tygodniu eksperymentu. Wykazano, iż zonisamid zmniejszył poetanoloze zmiany w czynności bioelektrycznej mózgu królików po 2., 4. oraz 6. tygodniu podawania etanolu, a także po 1. i 2. tygodniu abstynencji. W dalszych eksperymentach oceniających wpływ zonisamidu na procesy pamięciowe uzyskano zróżnicowane wyniki, gdyż wpływ leku na te procesy zależał od zastosowanego modelu badawczego, dawki i sposobu podania. Zarówno w teście labiryntu wodnego, jak i w teście biernego unikania nie uzyskano wyników jasno

wskazujących na korzystny wpływ zonisamidu na pamięć. Przejściowy istotny statystycznie wpływ zaobserwowano w teście Morrisa u szczurów po 12 godzinach abstynencji, w drugim dniu badania, u zwierząt otrzymujących zonisamid. Efektu tego nie obserwowano u szczurów po pierwszym tygodniu abstynencji. Natomiast stwierdzono korzystny wpływ zonisamidu na procesy pamięciowe u szczurów w okresie abstynencji w teście kontekstualnego warunkowania strachu. Warto podkreślić dużą staranność i dociekliwość Autorki przy opisywaniu wszelkich różnic w otrzymanych wynikach.

Wnikliwe **omówienie wyników** Autorka uzupełniła interesującą **dyskusją**, napisaną na 13 stronach pracy. W części tej Doktorantka uzasadniła celowość przeprowadzonych badań farmakologicznych, a uzyskane wyniki własne dotyczące zonisamidu porównała z wynikami innych badaczy. Ponadto Autorka przytoczyła wyniki badań dotyczące możliwości zastosowania innych leków przeciwpadaczkowych w terapii uzależnienia od alkoholu, a także ich wpływu na procesy pamięciowe, zarówno z badań eksperymentalnych, jak również u pacjentów z padaczką.

Uzyskane wyniki badań własnych zostały podsumowane w postaci pięciu wniosków szczegółowych oraz szóstego stanowiącego konkluzję końcową pracy. Rozprawa doktorska została zakończona streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz prawidłowo dobranymi pozycjami literaturowymi, głównie z ostatnich lat. Wysoko oceniam umiejętność Autorki korzystania z piśmiennictwa. Ponadto należy podkreślić staranność przygotowanej pracy, dbałość o formę graficzną oraz stosowane słownictwo.

Z obowiązku recenzenta chciałam zwrócić uwagę, że tytuły poszczególnych podrozdziałów w rozdziałach: *Część doświadczalna* oraz *Wyniki* powinny być przedstawione w jednolity sposób np. nazwa testu w języku polskim, a w nawiasie w języku angielskim. Natomiast tytuły podrozdziałów 3.1.4, 3.1.5 oraz 3.3.4 i 3.3.5 brzmieć odpowiednio: „Test kontekstualnego warunkowania strachu” oraz „Test sygnałowego warunkowania strachu”. Warto też w pracy w języku polskim stosować w pełni spolszczone nazwy leków: „lewetyracetam” (nie „lewetiracetam”) oraz retygabina (nie „retigabina”). Dodatkowo niepotrzebne wydaje się posługiwanie niektórymi skrótami np. UA (uzależnienie od alkoholu), gdyż utrudnia to czytanie pracy. Ponadto zabrakło rozwinięcia szeroko stosowanego skrótu: metoda farmako-EEG (metoda farmakoelektroencefalografii). Dyskusję kończy stwierdzenie: „Natomiast na szczególne podkreślenie zasługuje korzystny wpływ leku na objawy zespołu abstynencyjnego u tych zwierząt, obserwowany we wszystkich modelach badawczych”, które wydaje mi się zbyt dużym uogólnieniem. Proszę zatem Panią

Doktorantkę o komentarz. Te drobne uchybienia oraz nieliczne błędy literowe zauważone w trakcie czytania niniejszej pracy (na stronach 28, 31, 32, 34, 36, 39, 73 i 114) w żadnym stopniu nie pomniejszają jej wartości.

Podsumowując, moja ocena merytoryczna pracy jest bardzo wysoka, postawione cele pracy zostały zrealizowane, a wyniki zostały logicznie omówione i stanowią istotny element nowości oraz wkład w poznanie nowych możliwości wykorzystania leków przeciwpadaczkowych, tj. w leczeniu uzależnienia od alkoholu. Podjęta tematyka badawcza, szeroki panel pracochłonnych badań eksperymentalnych oraz interpretacja i dyskusja wyników świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu i kompetencjach Doktorantki w planowaniu oraz prowadzeniu badań w zakresie farmakologii eksperymentalnej. O dużej wartości wykonanych badań świadczy opublikowanie części wyników w postaci dwóch oryginalnych artykułów (w tym w jednej pracy Doktorantka jest pierwszym autorem) w czasopiśmie z tzw. listy filadelfijskiej o znaczącym współczynniku oddziaływania.

Wnioski:

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Agaty Krupy-Burtnik pt. „Wpływ zonisamidu na wybrane ośrodkowe efekty działania etanolu stosowanego długotrwale w zwierzęcych modelach eksperymentalnych” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach i tytułach naukowych, w związku z czym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Agaty Krupy-Burtnik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na aktualność podjętej tematyki, ogromny panel badawczy zastosowany przez Doktorantkę, wysoką jakość merytoryczną i edytorską rozprawy doktorskiej, jak również fakt opublikowania wyników badań w formie dwóch oryginalnych prac w czasopiśmie z listy filadelfijskiej posiadającym znaczący współczynnik oddziaływania pragnę rekomendować rozprawę doktorską mgr Agaty Krupy-Burtnik do wyróżnienia.

dr hab. Anna Rapacz