



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Kraków, 16 kwietnia 2024

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

pt. „Wpływ wybranych leków przeciwpsychotycznych na biochemiczne aspekty choroby Alzheimera”

wykonanej przez **mgr farm. Marię Podsiedlik**

pod kierunkiem dr hab. n. med. Joanny Sikory, prof. Uczelni

oraz dr hab. n. farm. Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, prof. Uczelni

na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Choroby neurodegeneracyjne tj. demencja, choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona, stanowią ogromny problem społeczno-ekonomiczny, zwłaszcza patrząc na konsekwencje wydłużającej się średniej długości życia. Proces starzenia się organizmu człowieka to nieuchronne zjawisko fizjologiczne, którego dynamika zależy od wielu czynników, genetycznych, osobniczych i stresogennych. Wraz ze starzeniem społeczeństwa wzrasta liczba chorych wymagających opieki. Biorąc pod uwagę brak skutecznych form leczenia, trudności wczesnego wykrywania oraz koszty opieki nad chorymi można przypuszczać, że ich liczba będzie wzrastać. Już teraz sugeruje się, że choroby neurodegeneracyjne stanowią plagę XXI w.

Podłoże chorób neurodegeneracyjnych stanowią zaburzenia struktury lub czynności komórek nerwowych, objawiające się problemami z poruszaniem lub obniżeniem sprawności umysłowej. Choroba Alzheimera jest chorobą zwyrodnieniową mózgu, która charakteryzuje się postępującymi zaburzeniami pamięci oraz zachowaniami, które z czasem całkowicie uniemożliwiają prawidłowe funkcjonowanie człowieka. Skutkiem postępującej, nieodwracalnej degeneracji neuronów jest brak kontaktu chorego z otoczeniem. Uważa się, że choroba ta stanowi najczęstszą przyczynę otępienia u osób po 65 roku życia. Utracie pamięci i zaburzeniom zachowania mogą towarzyszyć objawy neuropsychiatryczne, generujące u chorych nadmierne pobudzenie, agresję czy lęk.

Choroba Alzheimera jest chorobą złożoną o heterogennej etiologii, a dokładna jej przyczyna pozostaje nieznana. Istniejące koncepcje tj. hipoteza cholinergiczna, agregacji β -amyloidu, propagacji białka tau czy hipoteza stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego, wskazują na czynniki przyczyniające się do rozwoju choroby. W oparciu o ich mechanizmy podejmowane są próby opracowania leków, jednak obecnie stosowane

leczenie ma charakter objawowy, nie likwiduje przyczyn choroby, a jedynie łagodzi lub zwalcza jej objawy. W celu poprawy stanu chorego i spowolnienia klinicznych objawów choroby Alzheimera obok leczenia farmakologicznego inhibitorami esteraz (m.in. donepezil, galantamina), przeciwciałami monoklonalnymi (aducanumab, lecanemab) oraz memantyną, włączane są leki przeciwpsychotyczne (m.in. haloperidol, kłozapina) oraz terapie psychologiczne (terapia kognitywna, reminiscencyjna, zajęciowa i środowiskowa).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy analizy wpływu wybranych leków przeciwpsychotycznych na biochemiczne aspekty choroby Alzheimera. Biorąc pod uwagę wykazany w badaniach *in silico* potencjał niektórych leków przeciwpsychotycznych w leczeniu choroby Alzheimera należy stwierdzić, że wybrany temat dotyczy niezwykle istotnego i aktualnego problemu zdrowia ludzi. Praca wpisuje się w aktualny trend badań nad wykazaniem mechanizmów działania leków w odniesieniu do wybranych aspektów i hipotez rozwoju choroby Alzheimera. Doktorantka koncentruje uwagę na ocenie działania wybranych leków przeciwpsychotycznych na elementy trzech podstawowych hipotez powstawania i rozwoju choroby Alzheimera: cholinergicznej, agregacji β -amyloidu oraz stresu oksydacyjnego.

Formalny układ rozprawy jest typowy dla opracowań naukowych o charakterze doświadczalnym, prezentowanych w formie opracowania i obejmuje prawie 240 stron. Układ rozprawy jest przejrzysty, całość została podzielona na 12 głównych rozdziałów, ułożonych w klasycznym schemacie: część teoretyczna, metodologiczna oraz badawcza. Praca zawiera także spis treści, spis rysunków, tabel i wykresów oraz wykaz piśmiennictwa. Na początku opracowania umieszczono wykaz stosowanych skrótów, natomiast na końcu zawarte zostały streszczenia pracy w języku polskim i angielskim oraz opis dorobku naukowego Doktorantki. Załącznikami do pracy są: oświadczenie współautorów publikacji oraz Zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Wstęp obejmuje 49 stron, na cel pracy i część metodyczną przypada 44 strony, prezentacja wyników, ich omówienie oraz dyskusja wraz z wnioskami zajmują 77 stron. Uzyskane w pracy wyniki Doktorantka przedstawiła w 47 tabelach oraz zilustrowała na 13 rysunkach i 42 wykresach. W rozdziale Piśmiennictwo, na 28 stronach wykazano 325 pozycji cytowanych pozycji, z czego ponad 90% to materiały anglojęzyczne. Kolejność rozdziałów jest właściwa i zgodna z zasadami przyjętymi w redagowaniu prac w takiej formie. Przedstawione wyniki prawidłowo wprowadzono poprzez poprzedzający je przegląd literatury, uzasadnienie podjętej problematyki, cel i zakres prowadzonych badań oraz prezentację metodyki, jak również zostały one przedyskutowane w oparciu o wyniki badań innych autorów. Strona edytorska pracy jest poprawna, prezentacja wyników czytelna, a kluczowe problemy badawcze, decydujące o wartości poznawczej przeprowadzonych badań zostały wyraźnie zaakcentowane. Tabele zawierające zestawienia otrzymanych wyników wraz ze statystycznymi wskaźnikami zostały zaprojektowane w sposób prawidłowy. Także zamieszczone

w pracy rysunki i wykresy przygotowane są starannie, stanowią przejrzysty obraz rezultatów przeprowadzonych badań.

Recenzowana praca miała charakter eksperymentalny. Dokonując oceny merytorycznej należy stwierdzić, że badania zostały odpowiednio zaplanowane, a dobór substancji, typu eksperymentów oraz aparatury badawczej, jak też sposób przeprowadzenia badań oraz analiza wyników i ich dyskusja były właściwe. Tytuł pracy odpowiada założeniom i treści rozprawy, a wybór tematu badawczego świadczy o zorientowaniu Doktorantki na bieżących problemach w aspekcie zdrowia społecznego i możliwościach potencjalnego wykorzystania badanych substancji w profilaktyce choroby Alzheimerera.

W części teoretycznej Doktorantka zawarła wprowadzenie do podjętej tematyki badań, przybliżyła problem chorób neurodegeneracyjnych koncentrując uwagę na chorobie Alzheimerera. Przedstawiła dane epidemiologiczne, stadia przebiegu choroby odnosząc się do stopnia upośledzenia funkcji poznawczych, oraz stosowane metody diagnostyczne. Dużo uwag poświęciła prezentacji etiologii choroby, kolejnych hipotez opisujących jej przyczyny, tj. teorii cholinergicznej (opierającej się o proces degradacyjny prowadzący do uszkodzenia grup neuronów cholinergicznym w hipokampie, korze czołowej, ciele migdałowatym, jądrze podstawnym i przegrodzie przyśrodkowej), amyloidowej (związanej z niewłaściwą obróbką proteolityczną białka prekursorowego β -amyloidu), teorii białka tau (warunkującego zachowanie optymalnego procesu transportu neuroprzekazników i hormonów wzdłuż wypustek aksonalnych) oraz teorii stresu oksydacyjnego (powstającego na skutek podwyższonego poziomu reaktywnych form tlenu lub zmniejszenia aktywności układów antyoksydacyjnych). Równocześnie przeprowadziła analizę dostępnej literatury w prezentowanej tematyce oraz omówiła problemy farmakoterapii choroby Alzheimerera, omawiające mechanizmy działania oraz skuteczność stosowanych leków. Opracowanie dotyczy nie tylko leków odpowiadających wspomnianym wcześniej hipotezom, ale także stosowanych w leczeniu stanu zapalnego w mózgu (teoria przeciwzapalna) oraz substancji pochodzenia naturalnego o właściwościach antyoksydacyjnych (np. kurkumina, koenzym Q10). Kolejne informacje zawarte we Wstępie dotyczą istoty zastosowania leków przeciwpsychotycznych w chorobie Alzheimerera oraz strategii repozycjonowania leków, dających możliwości odkrywania nowych właściwości znanych leków stosowanych w terapii innych schorzeń. Omówienie wymienionych zagadnień wymagało od Autorki znacznego nakładu pracy, co świadczy nie tylko o pracowitości, ale także umiejętności selekcji piśmiennictwa wprowadzającego do przeprowadzonych w dalszej części analiz.

W kolejnej części rozprawy Doktorantka wskazała założenia pracy. Głównym celem badań było określenie potencjalnego wpływu leków przeciwpsychotycznych tj. promazyna, haloperidol, bromperidol, benperidol, pimozyd, penfluridol i kwetiapina, na wybrane aspekty biochemiczne mające udział w terapii choroby Alzheimerera. Szczegółowe zadania badawcze zostały przedstawione precyzyjnie i stanowią logiczną całość z dyskutowanymi danymi literaturowymi.

W kolejnym rozdziale wyszczególnione zostały materiały i metody badawcze. Zebrano tutaj informacje o stosowanych odczynnikach, badanych związkach oraz hodowlach komórkowych. Następnie zostały opisane procedury przygotowania materiału biologicznego (osocza, zawiesiny erytrocytów, ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej i astrocytów), i metodyka: oznaczeń stopnia hamowania aktywności acetylocholinoesterezy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BuChE), wyznaczania wartości IC₅₀ oraz parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznych, a także określenia synergizmu działania badanych leków. Doktorantka opisała procedury postępowania mającego na celu określenie wpływu leków przeciwpsychotycznych na agregację β -amyloidu oraz ocenę ich potencjału antyoksydacyjnego w warunkach stresu oksydacyjnego w modelu erytrocytarnym i hodowli komórkowej. Wraz z oceną wpływu leków na żywotność komórek wykonana została mikroskopowa ocena ich morfologii. Wszystkie badania zostały właściwie zaplanowane i opracowane dla realizacji założonego celu.

W następnym rozdziale dysertacji Doktorantka przedstawiła wyniki przeprowadzonych analiz wraz z analizą statystyczną oraz ich szczegółowym omówieniem. Wyniki bezpośrednich oznaczeń zostały opracowane starannie i przedstawione w klarowny sposób w postaci tabel oraz wykresów. Doktorantka wykazała dużą dojrzałość naukową w przeprowadzeniu analizy danych i omówieniu uzyskanych wyników. Podsumowanie wyników stanowi równocześnie próbę oceny zależności aktywności badanych leków od ich struktury chemicznej. Najaktywniejsze okazały się pochodne tiazepiny/fenotiazyny zawierające atomy S i N (kwetiapina i promazyna) oraz pochodna butyrofenonu z ugrupowaniem bromofenylowym (bromperidol). Dużą część rozdziału stanowi dyskusja wyników eksperymentów w kontekście oceny parametrów biochemicznych związanych z klinicznym obrazem choroby Alzheimera oraz hipotez wskazujących na ewentualne przyczyny tej choroby. Zarówno piśmiennictwo wyszczególnione w rozdziale stanowiącym wprowadzenie, jak i wykorzystane w dyskusji wyników jest dobrane właściwie i pozwala na interpretację otrzymanych przez Doktorantkę wyników w kontekście badań innych autorów.

Rozprawę kończy 7 wniosków, które są syntetycznym podsumowaniem podjętych badań i sumaryczną odpowiedzią na postawione cele badawcze. Otrzymane wyniki sugerują, że stosowanie leków przeciwpsychotycznych u pacjentów z chorobą Alzheimera może przynieść pewne korzyści kliniczne, choć równocześnie mogą one osłabić lub w niekontrolowany sposób nasilić działanie inhibitorów cholinoesteraz stosowanych w terapii. Wykazanie ich działania przeciwutleniającego oraz hamującego wpływu na powstawanie złogów β -amyloidu może też wspomóc terapię pacjentów bez choroby Alzheimera leczonych lekami przeciwpsychotycznymi, w zapobieganiu lub spowolnieniu jej rozwoju.

W dysertacji zacytowano 325 prac, zarówno publikacji jak i źródeł internetowych. Mając na uwadze dużą ilość prac naukowych w ramach podjętej tematyki należy stwierdzić, że dobór bibliografii jest odpowiedni i obejmuje najważniejsze i aktualne pozycje. Poszczególne źródła zostały we właściwy sposób wykorzystane przez Doktorantkę we wszystkich częściach pracy.

Recenzowana praca zawiera elementy nowości. Autorka zwróciła uwagę na brak doniesień dotyczących prób oszacowania potencjalnego zastosowania leków przeciwpsychotycznych jako wspomagaczy do klinicznie zatwierdzonych inhibitorów acetylocholinoesterazy. Wydaje się to być szczególnie istotne w kontekście potencjalnych interakcji (synergizmu bądź antagonizmu) zachodzących między lekami stosowanymi w terapii choroby Alzheimera a neuroleptykami. Wykazanie synergistycznego działania mogłoby stanowić uzasadnienie klinicznej korzyści dla pacjenta chorującego na chorobę Alzheimera z jednocześnie występującymi objawami demencji.

Otrzymane w wyniku przeprowadzonych analiz nowe dane stanowią oryginalne osiągnięcie Doktorantki w prezentowanej tematyce badawczej. Prace doświadczalne zostały przeprowadzone starannie i właściwie przedstawione. Rezultaty badań stanowiących podstawę dysertacji umożliwiają ocenę wyników prognozowanych w testach *in silico* oraz pozwalają oszacować nowe możliwości potencjału farmakologicznego badanych leków przeciwpsychotycznych. Ocena otrzymanych wyników pod kątem potencjalnych zastosowań klinicznych stanowi jej dodatkowy atut i może mieć istotne znaczenie dla dalszych kierunków badań, także w praktyce klinicznej terapii schorzeń neurodegeneracyjnych. Dodatkowym, wartościowym efektem pracy Doktorantki jest publikacja części wyników w renomowanym czasopiśmie naukowym (Int. J. Mol. Sci., 2022; IF 5,6) oraz ich prezentacja na konferencjach.

Po zapoznaniu się z treścią pracy stwierdzam, że główny cel i zakres badań zostały określone prawidłowo, a rozprawę napisano poprawnie i przystępnie. Jednocześnie, z obowiązku Recenzenta poniżej zamieszczam kilka uwag:

- dlaczego stężenia leków w próbie (opisane w części dotyczącej przygotowania roztworów do badań) oraz zakresy stężeń roztworów powstałych przez rozcieńczenie są tak zróżnicowane w przypadku poszczególnych związków?
- stężenia większości analizowanych leków podano w jednostkach „ $\mu\text{g/L}$ ”, dlaczego zatem w przypadku kwetiapiny, donazepilu i rywastygminy jest to „ $\mu\text{mol/L}$ ”?
- w badaniach prowadzonych z zastosowaniem metody Ellmana dokonano zmiany długości fali – szkoda, że nie zaprezentowano Rysunku zawierającego widmo absorpcji, w oparciu o które dokonano wspomnianej modyfikacji;
- walidacja metody analitycznej powinna obejmować, poza określeniem zakresu liniowości, także wyznaczenie granic wykrywalności i oznaczalności (LOD i LOQ) oraz określenie jej precyzji i dokładności;
- w kilku miejscach opis „Wykonanie pomiarów” poprzedza informację skąd pochodzi dana procedura. W tych przypadkach cały opis wykonania zostaje powtórzony (włącznie z wzorami obliczeń) – niepotrzebnie te informacje są opisywane dwukrotnie, wystarczy jeden opis i potem można odnieść się do danego fragmentu;
- brak jest cytowania w tekście rozprawy Tabel 15, 18-20, 24-27, 29-32;
- str.157: „Rysunki 11 i 12 przedstawiają zdjęcia odpowiednio...” – wydaje się, że zgodnie z numeracją raczej chodzi o Rysunki 12 i 13, zamieszczone na kolejnych stronach pracy.

Powyższe uwagi nie mają jednak wpływu na wartość merytoryczną rozprawy oraz moją, w pełni pozytywną jej ocenę. Wybór problemu badawczego oraz zakres analiz należy ocenić jako zasadny i istotny, zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Przeprowadzone badania *in vitro* mogą stanowić punkt wyjścia dla dalszych, pogłębionych badań *in vivo* w modelu zwierzęcym oraz obserwacji klinicznych.

Podsumowując stwierdzam, że przygotowana przez mgr Marię Podsiedlik rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego poszerzające stan istniejącej wiedzy. Wyniki przeprowadzonych badań udokumentowano w sposób nie budzący wątpliwości, a określony cel badawczy został zrealizowany. Prawidłowo dobrane metody badawcze, wykonane eksperymenty oraz interpretacja i dyskusja otrzymanych wyników dowodzą posiadania wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki farmaceutyczne oraz umiejętności prowadzenia pracy naukowej, spełniając w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w art.13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r. poz.1789 ze zm.) w związku z art.179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz.1669 ze zm.).

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa odpowiada warunkom stawianym tego typu opracowaniom na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Tym samym wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr farm. Marii Podsiedlik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na aktualność tematyki badawczej, wysoki poziom prowadzonych badań oraz dużą wartość uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie złożonej rozprawy doktorskiej. Praca przedstawia istotne walory naukowe oraz potencjalny charakter aplikacyjny, co jest dodatkowym atutem jej wartości, jako pracy poznawczej, a Pani mgr Maria Podsiedlik posiada dużą wiedzę na prezentowany temat i poprawny warsztat analityczny.



dr hab. Małgorzata Starek