



UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką

Dr hab. n farm. Marta Kruk-Słomka, profesor Uczelni

ul. Chodźki 4A (Collegium Pharmaceuticum), 20-093 Lublin

tel. (081) 448 7250



PODPIS ZAUFANY

MARTA MAGDALENA
KRUK-SŁOMKA
19.04.2023 22:56:26 [GMT+2]
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Lublin, dnia 19 kwietnia 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Białoń pt. *„Porównanie wpływu 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (1MeTIQ) i olanzapiny na zaburzenia behawioralne i molekularne obserwowane w zwierzęcych modelach schizofrenii”* wykonanej w Zakładzie Neurochemii Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem Pani dr. hab. Agnieszki Wąsik.

Schizofrenia jest jednym z najcięższych i najbardziej złożonych zaburzeń psychicznych. Na całym świecie choruje na nią około 25-50 mln ludzi. Ze względu na niejednorodny obraz kliniczny choroby, charakteryzujący się występowaniem objawów pozytywnych (urojeniowo-omamowych), negatywnych (deficytowych) oraz kognitywnych, leczenie powinno być złożone. Efektywna farmakoterapia jest jednak bardzo trudna. Patogeneza choroby nadal nie jest do końca poznana, opiera się na hipotezach, a leczenie choroby jest głównie objawowe a nie przyczynowe. Podstawą współczesnej farmakoterapii schizofrenii są leki przeciwpsychotyczne (tzw. neuroleptyki), które choć cechują się wysoką efektywnością działania wobec objawów pozytywnych, to mają ograniczoną skuteczność w łagodzeniu objawów negatywnych, nie kontrolując w ogóle (lub nawet pogarszając przebieg) objawów kognitywnych. Ponadto, stosowanie neuroleptyków obarczone jest szeregiem działań niepożądanych – od wspomnianych zaburzeń kognitywnych, przez tendencję do tycia, po zaburzenia depresyjne i próby samobójcze. Konsekwencją jest wprowadzanie innych leków co prowadzi do politerapii u pacjentów, a ta z kolei zwiększa ryzyko działań niepożądanych. Powyższe trudności związane z farmakoterapią schizofrenii są podstawowym wskazaniem do poszukiwania nowych punktów uchwytu i strategii terapeutycznych, by opracować takie leki, które będą nie tylko efektywne wobec wszystkich typów objawów schizofrenii, ale też będą posiadać korzystny profil farmakologiczny i profil bezpieczeństwa. Zagadnienia dotyczące właśnie

poszukiwania nowych potencjalnych leków o działaniu przeciwpyschotycznym stanowią przedmiot rozprawy doktorskiej **Pani mgr Magdaleny Białoń**.

Całość pracy stanowi 206 stron, oprawionego, jednostronnego wydruku komputerowego, formatu A4. Praca ma klasyczny układ, na który składają się wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, wykaz zastosowanych skrótów oraz bibliografia.

Praca składa się z 22-stronicowego wstępu, bardzo krótkiego jednozdaniowego celu pracy, 11-stronicowego opisu metod badawczych i statystycznych zastosowanych w pracy, opisowej części uzyskanych wyników przedstawionej na 107 stronach. Ta część została zilustrowana 33 wykresami i 18 tabelami. Omówieniu wyników badań (dyskusji) Autorka poświęciła 16 stron pracy, podsumowanie zawarto na 1 stronie (7 punktów), a wnioski końcowe na 1 stronie (2 punkty). Rozprawa zawiera bogaty wykaz, nieponumerowanego jednak, cytowanego piśmiennictwa, ułożonego alfabetycznie. Wszystkie pozycje piśmiennictwa to publikacje anglojęzyczne, większość pochodzi z ostatnich dwudziestu lat, w tym aż 65 publikacji zostało wydanych pomiędzy rokiem 2020 a 2022, a 1 publikacja została wydana w 2023 roku.

Struktura pracy i strona graficzna nie budzą zastrzeżeń, sugerowałabym jedynie dodanie wykazu tabel i wykresów co zdecydowanie ułatwiło by czytanie pracy. Praca została napisana starannie i przejrzysto graficznie; znalazło się trochę błędów językowych i edytorskich (błędne pisownie słów, braki odstępów, podwójne kropki, literówki), których nie sposób jest uniknąć i nie mają one istotnego znaczenia dla oceny pracy więc nie będę ich wymieniać. Znalazłam jednak kilka uchybień w opisie wyników, które prawdopodobnie są wynikiem niedopatrzenia Autorki. Podczas czytania pracy nasunęły mi się również pewne sugestie. Z obowiązku Recenzenta przestawię je poniżej.

Wstęp:

Autorka rozpoczyna pracę klasycznie, od wstępu liczącego 22 strony. W tym rozdziale Autorka omawia schizofrenię jako chorobę, podając jej charakterystykę ogólną, epidemiologię, neurobiologię oraz główne teorie dotyczące patofizjologii choroby. Autorka szczególną uwagę zwraca na teorię glutaminianową schizofrenii, opisując w tym miejscu modele schizofrenii bazujące na teorii glutaminianowej. W dalszej części wstępu Autorka opisuje rolę stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w patogenezie schizofrenii. Następnie przedstawione zostają zasady współczesnej farmakoterapii schizofrenii, koncentrując się lekach neuroleptycznych, między innymi na olanzapinie. Na koniec Doktorantka w bardzo szczegółowy sposób przedstawia profil farmakologiczny związku, który jest przedmiotem jej badań – 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny 1(MeTIQ).

Wstęp został napisany w sposób czytelny i zwięzły, z podziałem na rozdziały. Momentami wkładały się jednak chaotyzy my więc sugerowałabym wprowadzenie podrozdziałów, np. czynniki ryzyka schizofrenii itd. co wpłynęłoby na większą przejrzystość. We wstępie powinny być również po raz pierwszy wyjaśnione wszystkie skróty pojawiające się w tekście. Zabrakło wyjaśnienia skrótu GBD (Global, Burden Disease); DA (dopamina); SOD, GPx, CAT, FGA, itd. I odwrotnie – wprowadzone raz skróty powinny być konsekwentnie używane w całej pracy doktorskiej (np. stres oksydacyjny (OS); glutaminian (GLU)). Zastanawia mnie również prawidłowość sformułowania „regeneracja OUN” (str. 10 pracy). Układ nerwowy cechuje się bardzo powolnym tempem regeneracji (tygodnie, miesiące lub lata), a w skrajnych przypadkach jego pełna regeneracja jest praktycznie niemożliwa. Z tego względu być może słusznym jest zastąpienie słowa „regeneracja” w przypadku OUN słowem „mechanizmy naprawcze”? Dodatkowo, tytuł rozdziału 1.6 „Metody leczenia schizofrenii” również nie do końca oddaje tematykę w nim zawartą. Jeśli chodzi o metody leczenia schizofrenii obecnie dysponujemy metodą farmakologiczną, przy użyciu dostępnych leków; metodą behawioralną (przy użyciu psychoterapii), jak również metodą przy użyciu elektrowstrząsów. Ponieważ w rozdziale 1.6 Autorka opisuje tylko dostępną terapię farmakologiczną schizofrenii, być może słusznym byłoby skonkretyzowanie tytułu rozdziału np. „Farmakologiczna metoda schizofrenii” lub „Farmakoterapia schizofrenii”.

Cel pracy:

Cel pracy został przedstawiony w postaci jednego (!) zdania. Jak na pracę doktorską, która liczy 206 stron, z bardzo dużą ilością doświadczeń, jest to zdecydowanie za mało. Cel pracy doktorskiej powinien być przedstawiony jako próba rozwiązania problemu naukowego, pogłębienia istniejącej wiedzy na dany temat, z przytoczeniem danych świadczących o celowości postawionego pytania/problemu naukowego. W moim odczuciu w tej pracy doktorskiej niestety zabrakło jasno sformułowanej hipotezy bądź hipotez badawczych.

Materiały i Metody:

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach, w klatkach przetrzymywane po 5. Wszystkie procedury eksperymentalne wykonane na zwierzętach zostały przeprowadzone po uzyskaniu stosowanej zgody/zgód Lokalnej Komisji Etycznej (tutaj brak w pracy podania numerów zgód) oraz zgodnie z międzynarodowymi wytycznymi. Do badań wybrano endogenną aminę, 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinolinę 1(MeTIQ), by zbadać jej potencjał przeciwpyschotyczny w testach behawioralnych i biochemicznych oraz porównać uzyskane efekty farmakologiczne z działaniem atypowego leku przeciwpyschotycznego - olanzapiny. Do modelowania objawów schizofrenii u

zwierząt wykorzystano antagonistę receptorów NMDA - MK-801. W tej części Autorka opisuje najpierw zastosowane testy behawioralne (test podniesionego labiryntu krzyżowego do oceny zachowań lękowych; test rozpoznawania nowego obiektu - do oceny procesów kognitywnych; test interakcji socjalnych; test pamięci strachu) oraz procedury użyte do badań biochemicznych i molekularnych (analiza poziomu monoamin i ich metabolitów; glutaminianu; enzymów związanych ze stresem oksydacyjnym; cytokin). W dalszej części pracy znajduje się opis badań in vitro obejmujący test redukcji MTT; test uwalniania LDH; analizę jąder pyknotycznych. Do analizy statystycznej wyników wykorzystano jedno- lub dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA lub test t-studenta. Wybrany testem post-hoc był test Duncana. Dobór substancji narzędziowych i metod badawczych uważam za jak najbardziej prawidłowy.

Ta część pracy jest przedstawiona w sposób zwięzły i dość czytelny, choć komentarza wymagają pewne drobne kwestie. Być może bardziej czytelne byłoby przedstawienie oddzielenie w podrozdziałach lub w tabeli/schemacie procedury podawania związków, a oddzielnie opisu aparatury badawczej. W opisie podawania związków brak jest także wyjaśnienia w czym były rozpuszczane poszczególne związki; brak jest również jasnego przedstawienia na podstawie których danych literaturowych zostały wybrane dawki do poszczególnych doświadczeń (brak stosownych cytowań). Wyjaśnienia wymagają następujące kwestie: dlaczego raz wybrana jest do doświadczeń dawka MK-801 - 0.1 mg/kg a raz 0.3 mg/kg; raz 1MeTIQ 25 mg a raz 50 mg; dlaczego wybrano dawkę 3 mg dla olanzapiny, 10 mg lub 20 mg dla ketaminy itd. Również na jakiej podstawie wyznaczono odstępy czasowe pomiędzy podawaniem związków a przeprowadzanymi testami? Dodatkowo, nie każdy opis danej procedury badawczej jest zakończony stosownym cytowaniem. Podobnie, jak w części wstępu, zabrakło wyjaśnienie po raz pierwszy niektórych wprowadzonych skrótów np. NA lub użycia skrótu, który był już wprowadzony, zamiast pełnej nazwy np. GLU.

Wyniki:

Przedstawienie wyników jest najobszerniejszą częścią pracy (107 stron). Wyniki zaprezentowane są w sposób raczej zrozumiały. Ryciny i tabele są czytelne. Tak duża ilość wyników świadczy o ogromnej pracy Doktorantki, wskazując na duże Jej zaangażowanie i poświęcony czas w wykonywanie doświadczeń. Nie mam uwag do strony graficznej, choć sugerowałabym zmienić kolejność prezentacji wyników, czyli najpierw opis statystyczny, a dopiero później wykres odnoszący się do tego wyniku. Ułatwiłoby to zdecydowanie analizę poszczególnych wykresów w korelacji z danymi statystycznymi.

O ile graficzna strona przedstawienia wyników nie budzi moich zastrzeżeń, to pewne sugestie odnoszą się do interpretacji i opisu wyników. Być może ze względu właśnie na tak dużą ilość wyników, w tej części pracy znalazłam najwięcej błędów. Po pierwsze, aby uniknąć błędów w interpretacji sugerowałabym aby w każdym opisie wyników było zaznaczone dla jakich grup zwierząt badawczych były prowadzone analizy statystyczne. Powinno być też jasno podkreślone jakie związki/związek otrzymywała grupa kontrolna. Po drugie należałoby zachować jeden schemat opisu wyników: najpierw grupy które otrzymywały pojedyncze iniekcje (np. KET; OLA; 1MeTIQ, a dopiero potem grupy łączone np. 1MeTIQ + KET i OLA + KET). Zdecydowanie poprawiłoby to czytelność uzyskanych wyników, a być może uchroniłoby przed poniższymi pomyłkami. Dodatkowo, w pracy pod każdym wykresem lub tabelą są oznaczenia np. *, **, *** lub #, ##, ### co nie znaczy, że na danym wykresie są wszystkie te statystyczności. Sugerowałabym dopasować opis pod wykresem czy tabelą konkretnie do zaprezentowanych na danym wykresie/tabeli wyników i istotności statystycznej, które faktycznie tam się znajdują.

Wyjaśnienia w tej części wymagają następujące punkty:

- Rys. 2C: przy OLA3 na wykresie jest *; w opisie jest $p < 0.01$ (dla grupy samej OLA statystyczność powinna być $p < 0.05$); zaraz potem jest w opisie wyników, że „iniekcja OLA z KET również znacząco zmniejszyła całkowitą liczbę wejść do ramion labiryntu ($p < 0.05$)”; w tym miejscu nie wiadomo do czego porównane są grupy? Bo zgodnie z wykresem istotność statystyczną zaobserwowano w grupie OLA i KET w porównaniu do grupy solnej ($p < 0.05$) oraz do grupy ketaminowej ($p < 0.01$). Wydaje mi się że taki sposób przedstawienia wyników byłby bardziej czytelny.
- Rys. 4C: Na rysunku jest dla grupy OLA 3 **, a w opisie jest „testy t-studenta dla jednej próby wykazał istotność statystyczną dla wartości indeksu dyskryminacji w grupie kontrolnej, 1MeTIQ 25 mg, OLA 3 mg (wszystkie $p < 0.001$)” czyli dla OLA 3 powinno być $p < 0.01$; podobnie na wykresie jest 1MeTIQ + KET *** a dla OLA + KET **, a w opisie jest „w obu badanych grupach łącznych (oba $p < 0.01$)”; powinno być dla OLA + KET ($p < 0.01$) a dla 1MeTIQ + KET ($p < 0.001$).
- Rys. 8A: Na wykresie jest ## dla grupy 1MeTIQ25x7 + MK-801 0.1 mg vs MK-801 0.1 mg a w opisie jest: „w grupie łącznej, wielokrotne podania 1MeTIQ podawane razem z jednokrotną dawką MK-801, spowodowały istotny spadek czasu interakcji socjalnych w porównaniu zarówno

ze zwierzętami z grupy kontrolnej ($p < 0.001$) jak i z grupy MK-801 ($p < 0.05$)”; powinno być $p < 0.01$.

- Rys 8B: Na wykresie jest ### dla grupy 1MeTIQ25x7 + MK-801 0.1 mg vs MK-801 0.1 mg a w opisie jest: „7-krotne podanie 1MeTIQ wraz z jednokrotną iniekcją MK-801 spowodowało istotny spadek liczby interakcji socjalnych w porównaniu z grupami otrzymującymi sól fizjologiczną ($p < 0.001$) i MK-801 ($p < 0.01$)”; powinno być $p < 0.001$.
- Rys. 9B: Dwa razy jest powtórzony opis wyników dotyczący olanzapiny: „Zarówno 1MeTIQ, jak i OLA, podane łącznie z MK-801 istotnie ($p < 0.001$) zmniejszyły % czasu bezruchu w AFC w porównaniu z grupą kontrolną.” I zaraz potem jest kolejne zdanie: „Olanzapina podana razem z MK-801 istotnie ($p < 0.001$) skróciła % czasu bezruchu”. Przecież to było napisane wcześniej. Nie ma sensu powtarzać.
- Rys. 28A: Na wykresie jest # dla grupy 1MeTIQ 25 mg + MK-801 0.1 mg/kg i ## dla grupy 1MeTIQ 50 mg + MK-801 0.1 mg/kg vs. grupa MK-801 0.1 mg/kg; a w opisie jest: „W grupach łącznych, 1MeTIQ (25 lub 50 mg/kg) podawany razem z MK-801 odwracał efekt MK-801 i znacząco (oba $p < 0.05$) zmniejszał aktywność GPx.” Powinno być, że dawka 1MeTIQ 25 mg ($p < 0.05$) oraz dawka 1MeTIQ 50 mg ($p < 0.01$) odwracały aktywność GPx indukowaną podaniem MK-801 0.1 mg.
- Rys 28B: Na wykresie nie ma zaznaczonej statystyczności przy grupie MK-801 0.1 mg/kg, jest tylko dla 1MeTIQ 25 mg (* $p < 0.05$), a w opisie wyników jest: „Analiza post hoc wykazała istotny ($p < 0.05$) wzrost aktywności GR po iniekcjach MK-801 lub 1MeTIQ (50 mg/kg) w porównaniu z grupą kontrolną”.
- Tab. 2. W opisie jest „Ta sama analiza statystyczna wykazała istotny efekt podanych substancji ($F[7,40]=5.19$, $p < 0.01$) na poziom 5-HIAA w FCX. Analiza post hoc wykazała znamieny spadek stężenia tego metabolitu w stosunku do poziomu kontrolnego po podaniu OLA ($p < 0.05$)”. W tabeli natomiast nie ma statystyczności przy OLA 3 jest natomiast przy 1MeTIQ 50 (* $p < 0.05$ vs. kontrola - sól), co nie zostało opisane w tekście.
- Tab. 4. W opisie jest: „Ta sama analiza statystyczna ujawniła istotny wpływ iniekcji ($F[7,40]=6.71$, $p < 0.01$) na poziom 5-HIAA w HIP szczura. Test post hoc wykazał istotny

spadek stężenia 5-HIAA ($p < 0.01$) w grupie 1MeTIQ, która otrzymała 1MeTIQ (50 mg/kg) zarówno sam, jak i w połączeniu z KET (oba $p < 0.05$) w stosunku do grupy kontrolnej”. Natomiast w tabeli przy grupie 1MeTIQ 50 mg + KET 10 mg jest ** czyli powinno być $p < 0.01$ vs. grupa kontrolna.

- Tab. 6. W opisie jest: „Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA wykazała znamienny wpływ iniekcji ($F[7,40]=25.39$, $p < 0.05$) na poziom NA w STR szczura. Analiza post hoc ujawniła istotny spadek stężenia NA w grupie 1MeTIQ (25 mg/kg) ($p < 0.01$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Znaczne obniżenie poziomu tego neuroprzekaźnika było obserwowane w grupie łącznej (1MeTIQ 50 mg/kg + KET), zarówno w stosunku do wartości kontrolnej, jak i wartości z grupy KET (oba $p < 0.01$)”. Brak jest opisu statystyczności grup OLA 3 + KET 10 vs. grupa solna ($p < 0.05$), a ta statystyczność jest zaznaczona w tabeli.

Dyskusja:

Omówienie wyników (dyskusja) została podzielona na dwa rozdziały. Pierwszy dotyczył interpretacji wyników pochodzących z badań behawioralnych skorelowanych z badaniami neurochemicznymi: *ex vivo* i *in vivo*; drugi rozdział dotyczył badań molekularnych. Biorąc pod uwagę taką mnogość przeprowadzonych doświadczeń, omówienie ich wyników na 16 stronach mogłoby się wydawać niewystarczające i momentami lakoniczne. Mimo to, należy jednak podkreślić, że Dyskusja jest poprowadzona ciekawie i poprawnie, omawiając prawie wszystkie kwestie, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki. Cały rozdział dowodzi znajomości rozległego piśmiennictwa oraz umiejętności jego wykorzystania do oceny wyników własnych.

Podsumowanie:

Wnioski:

Po przeanalizowaniu i omówieniu wyników w rozdziale Dyskusja, Autorka podsumowuje najważniejsze rezultaty i formułuje siedem nadrzędnych wniosków w rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie”. Z kolei w kolejnym rozdziale zatytułowanym „Wnioski” Autorka formułuje dwa bardzo ogólnikowe wnioski. Sugerowałabym więc aby rozdziały Wnioski i Podsumowanie połączyć w jeden rozdział o tytule: „Wnioski końcowe i posumowanie” z tym, że to co Autorka opisuje jako podsumowanie nazwałabym wnioskami końcowymi (które przecież bezpośrednio wynikają z przeprowadzonych doświadczeń), natomiast na końcu dałabym podsumowanie w postaci tych dwóch punktów, które Doktorantka nazwała wnioskami.

Reasumując, całość pracy oceniam pozytywnie. Mocną stroną ocenianej pracy doktorskiej jest przede wszystkim aktualny, aczkolwiek bardzo trudno obszar badawczy, którego podjęła się Doktorantka. Pragnę przede wszystkim wyrazić uznanie dla tematyki ocenianej pracy, nie tylko ze względu na fakt złożoności problemu medycznego jakim jest schizofrenia, ale także mam nadzieję, że każda praca badawcza dotycząca problemu schizofrenii przyczyni się do coraz dokładniejszego poznania istoty choroby, i być może zwiększy w przyszłości potencjalne możliwości terapii tej choroby.

Pani mgr Magdalena Białoń w rozprawie doktorskiej zastosowała właściwe metody behawioralne i biochemiczne. Ilość doświadczeń, różnorodność metod badawczych jest imponująca, co świadczy o bardzo dużym przygotowaniu teoretycznym i praktycznym Pani mgr Białoń, pozwalającym Jej na swobodne poruszanie się w powyższym obszarze doświadczeń. Pani mgr Magdalena Białoń prezentuje zdecydowanie ogólną wiedzę teoretyczną będącą podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki medyczne. Z przekonaniem stwierdzam także, że Pani mgr M. Białoń wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, o czym świadczą dobrze zaplanowane i wykonane przez Doktorantkę doświadczenia zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej. Uzyskane wyniki mogą zdecydowanie zostać wykorzystane przy planowaniu kolejnych badań. Warto podkreślić także, że wyniki oprócz znaczenia poznawczego mogą mieć również implikacje praktyczne.

Uwagi krytyczne dotyczące treści pracy, przedstawiania wyników czy też komentarze redakcyjne, które zawarłam w mojej opinii podaję z obowiązku Recenzenta, mając nadzieję, że okażą się pomocne przy redagowaniu kolejnych publikacji naukowych.

Uważam, że rozprawa Pani Magdaleny Białoń pt. „Porównanie wpływu 1-metylo-1,2,3,4-tetrahydroizochinoliny (1MeTIQ) i olanzapiny na zaburzenia behawioralne i molekularne obserwowane w zwierzęcych modelach schizofrenii” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2022, poz. 574 z późn. zm.). Upoważnia mnie to do przedłożenia wniosku do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Białoń do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne. przewodu doktorskiego.


dr hab. n. farm. Marta Kruk-Słomka
profesor UM