

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana magistra Przemysława Danka pt.:
„Interakcje nowych atypowych neuroleptyków z cytochromem P450”
wykonanej w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu
Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem prof. dr hab. Władysławy Anny Daniel oraz
prof. dr hab. Wojciecha Piekoszewskiego z Wydziału Chemii UJ.

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana magistra Przemysława Danka wpisuje się w cykl badań, od lat prowadzonych pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Władysławy Anny Daniel, dotyczących znaczenia fizjologicznego i farmakologicznego układu cytochromu P450, ze szczególnym uwzględnieniem udziału izoenzymów cytochromu P450 w katalizowaniu głównych szlaków metabolicznych leków psychotropowych w wątrobie i mózgu. Praca doktorska pt.: „Interakcje nowych atypowych neuroleptyków z cytochromem P450” jest obszernym studium dotyczącym kompleksowej oceny wpływu asenapiny, iloperidonu i lurasidonu, nowych atypowych neuroleptyków wprowadzonych do terapii schizofrenii na przestrzeni ostatnich lat, na aktywność i ekspresję izoenzymów cytochromu P450 w mózgu i wątrobie. Enzymy CYP450 biorą udział w metabolizmie większości leków stosowanych w codziennej praktyce klinicznej oraz innych ksenobiotyków i substancji endogennych. Wykazano, że atypowe leki przeciwpsychotyczne stosowane w leczeniu schizofrenii, w odróżnieniu od typowych neuroleptyków, są skuteczne w leczeniu objawów wytwórczych oraz negatywnych schizofrenii. Wywołują mniej działań niepożądanych i są korzystne w leczeniu pacjentów opornych na konwencjonalne leki przeciwpsychotyczne. Podczas leczenia schizofrenii neuroleptyki są stosowane przewlekłe, aby wywołać efekt terapeutyczny i zapobiegać nawrotom choroby. Ich długotrwałe stosowanie może powodować interakcje z enzymami cytochromu P450, co może mieć wpływ nie tylko na metabolizm innych leków stosowanych jednocześnie z neuroleptykami, ale także fizjologicznie ważnych endogennych substancji. Dotychczas w literaturze naukowej zostały opisane izoenzymy CYP450 biorące udział w metabolizmie asenapiny, iloperidonu i

lurasidonu. Brak jest badań na temat wpływu tych leków na aktywność i ekspresję izoenzymów metabolizujących te leki, zwłaszcza podczas długotrwałej terapii. Dlatego temat badawczy podjęty przez Pana magistra Przemysława Danka należy uznać za oryginalny i uzasadniony. Poznanie i uwzględnienie wpływu mechanizmów interakcji pomiędzy badanymi lekami a izoenzymami CYP450, a szczególnie wpływu na mechanizmy regulacji CYP450, może mieć znaczenie w zwiększeniu skuteczności i bezpieczeństwa podczas przewlekłej terapii schizofrenii. Praca jest doskonałym przykładem kompleksowego podejścia do wyjaśnienia mechanizmów wpływu atypowych neuroleptyków na aktywność i ekspresję CYP450 w wątrobie i mózgu. Badania wykonano *in vitro* wykorzystując różne modele doświadczalne, takie jak: ludzkie mikrosomy wątrobowe, Supersomy zawierające ludzkie enzymy CYP o zdefiniowanej ekspresji i hepatocyty pochodzące od trzech dawców oraz *in vivo* u szczurów, które otrzymywały neuroleptyki przez okres 2 tygodni. Przeprowadzone badania poszerzają wiedzę na temat interakcji nowych, atypowych neuroleptyków z enzymami CYP450, zwłaszcza o zmiany zachodzące przy przewlekłym stosowaniu tych leków oraz uwzględniają badania dotyczące mózgowego cytochromu P450. Uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne osiągnięcie naukowe Autora. Mają one nie tylko znaczącą wartość naukową, ale także praktyczną. Mogą być wykorzystane w praktyce klinicznej. O wadze uzyskanych wyników świadczą prace opublikowane na podstawie tej rozprawy, w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym z listy filadelfijskiej, których Doktorant jest współautorem.

Formalny opis rozprawy

Treść rozprawy przedstawiona na 177 stronach, wzbogacona 4 tabelami i 38 rycinami, które przedstawiono zbiorczo w rozdziale X w postaci osobnego załącznika, jest zgodna z tematyką podjętych badań. Praca ma układ typowy i zawiera wszystkie elementy wymagane w tego typu opracowaniach, takie jak: wykaz skrótów użytych w pracy, wstęp będący wprowadzeniem i uzasadnieniem do zaplanowanych doświadczeń, cel pracy, opis materiału badawczego i zastosowanych metod, wyniki, dyskusję i wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, bibliografię składającą się z 294 pozycji prawidłowo cytowanych w tekście, ułożonych w sposób logiczny i uporządkowany oraz informację o finansowaniu projektu i spis publikacji, w których zostały opublikowane wyniki zrealizowanych badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Wstęp rozprawy stanowi doskonałe wprowadzenie czytelnika w zagadnienia, które były celem podjętych badań. Doktorant szczegółowo omówił budowę cytochromu P450, jego

rolę w metabolizmie związków endogennych i ksenobiotyków oraz miejsca występowania izoenzymów CYP450 w organizmie, podkreślając ich zmienność międzygatunkową, jak również konserwatywność i podobieństwo sekwencyjne niektórych z nich. Pozwala to na ustalenie u zwierząt sekwencji analogicznych do ludzkich i prowadzenie badań z udziałem organizmów modelowych. Uwzględnił podobieństwa i różnice izoenzymów CYP450 u człowieka i szczura, który był obiektem przeprowadzonych badań *in vivo*. Na szczególną uwagę zasługuje rozdział dotyczący fizjologicznej regulacji cytochromu P450 w wątrobie. W oparciu o najnowszą wiedzę, Autor omówił mechanizmy regulacji aktywności i ekspresji CYP450 na poziomie obwodowym i molekularnym oraz neuroendokrynną regulację cytochromu P450 przez układy monoaminergiczne. Osobny rozdział poświęcił regulacji mózgowych enzymów CYP450, które także były przedmiotem Jego badań. W ostatniej części wstępu przedstawił charakterystykę badanych leków oraz wpływ leków przeciwpsychotycznych na wątrobowe i mózgowe enzymy cytochromu P450. Doktorant zwrócił uwagę, że wpływ leków przeciwpsychotycznych na enzymy CYP450 jest złożony. Leki te mogą bezpośrednio lub pośrednio, na drodze różnych mechanizmów, wpływać na aktywność i regulację ekspresji CYP450, powodując występowanie istotnych klinicznie interakcji lekowych podczas długotrwałej terapii neuroleptykami. Oceniając tę część rozprawy doktorskiej na podkreślenie i uznanie zasługuje bardzo dobra znajomość badanej problematyki. Autor omówił w sposób wyczerpujący, w oparciu o najnowsze badania zagadnienia, które postanowił zrealizować w swojej pracy doktorskiej.

Cel rozprawy doktorskiej został dokładnie przemyślany. Autor uzasadnił istotę i znaczenie zaplanowanych badań oraz przedstawił ogólne założenia pracy. Ze względu na różnice w składzie jakościowym i ilościowym izoenzymów CYP450 w wątrobie i mózgu oraz różnice w regulacji enzymów w poszczególnych narządach i tkankach, badania przeprowadził *in vitro* oraz *in vivo* z wykorzystaniem kilku modeli badawczych. Pozwoliło to na wyjaśnienie kompleksowego wpływu atypowych neuroleptyków na aktywność i ekspresję wątrobowych i mózgowych enzymów CYP450 podczas przewlekłego stosowania tych leków, ponadto oddziaływania pomiędzy badanymi lekami a układami neuroprzekaźników w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym oraz wpływ na metabolizm substancji endogennych, biorących udział w regulacji ekspresji enzymów CYP450. Podjęte badania wskazują na bardzo szeroki zakres pracy włożonej w realizację tych założeń oraz zastosowanie nowoczesnych metod biologii molekularnej. Badania są oryginalne i nie zostały dotychczas opisane w literaturze naukowej. Cel został przedstawiony w sposób jasny, dobrze

umotywowany i określony, jednoznacznie wskazując na wnikliwe przeanalizowanie i zaplanowanie podjętych badań, jako całościowego eksperymentu.

Do tej części pracy mam jedną uwagę dotyczącą określenia: "chroniczne podawanie leków". Autor używa tego określenia wielokrotnie, także w innych rozdziałach, na rycinach i w tabelach. Jest to bezpośrednie tłumaczenie z języka angielskiego i powinno być zastąpione określeniem np. przewlekłe lub wielokrotne podawanie leków.

Materiały i metody

Do realizacji zaplanowanych badań Autor wykorzystał bardzo bogaty warsztat naukowy i nowoczesne metody analityczne. Techniki te wymagały dużej wiedzy teoretycznej i umiejętności manualnych. Szczegółowo opisał wszystkie zastosowane procedury w poszczególnych modelach badawczych. W modelu I badał bezpośredni wpływ atypowych neuroleptyków na aktywność enzymów CYP450 w ludzkich mikrosomach wątrobowych i Supersomach. Szybkość specyficznych reakcji metabolicznych oceniał w nieobecności oraz obecności leku dodanego *in vitro*. Stężenia substratów i ich metabolitów oznaczano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV (dla CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4) lub fluorescencyjną do oceny szybkości reakcji hydroksylacji bufuralolu katalizowanej przez CYP2D6. Metody te zostały wykorzystane także w innych modelach, w których oceniano aktywność CYP. W podrozdziale 4.1 dotyczącym badania aktywności CYP1A2 za pomocą reakcji 3-N-demetylacji kofeiny, Autor napisał [cyt.]: „Stężenie specyficznego substratu kofeiny i jej metabolitu 3-N-demetylokofeiny (paraksantyny) oznaczano...” Takie sformułowanie nie jest prawidłowe. Główny metabolit kofeiny – paraksantyna to 1,7-dimetyloksantyna, która powstaje w reakcji 3-N-demetylacji kofeiny. Prawidłowa nazwa paraksantyny to 1,7-dimetyloksantyna, a nie 3-N-demetylokofeina. W modelu II Autor badał pośredni wpływ atypowych neuroleptyków na aktywność i ekspresję enzymów CYP450 w hodowli ludzkich hepatocytów, które były traktowane lekami przez 72 godz. Ekspresję genów CYP450 mierzono za pomocą oznaczania poziomu mRNA enzymów CYP w komórkach wątroby metodą qRT-PCR. W modelu III Autor przeprowadził porównawcze badania bezpośredniego wpływu neuroleptyków na aktywność enzymu CYP2D w szczurzych mikrosomach wątrobowych i mózgowych. Model IV i V dotyczył oceny przewlekłego podawania wybranych neuroleptyków na aktywność i ekspresję CYP450 w szczurzej wątrobie i mózgu. W doświadczeniu tym wykorzystano mikrosomy wątrobowe i mózgowe. W modelu IV specyficzne substraty dodawano do mieszaniny inkubacyjnej *in vitro*, a szybkość specyficznych reakcji badano w nieobecności leków, które podawane przewlekłe *in vivo* zostały wypłukane *in vitro*. W otrzymanych

mikrosomach zmierzono stężenie białka odpowiednich enzymów CYP oraz ilość mRNA genów kodujących te enzymy. Dodatkowo, w surowicy oraz w przysadkach mózgowych oznaczono stężenia hormonów regulujących ekspresję genów CYP przy użyciu metody ELISA. W modelu V wykorzystano mikrosomy pochodzące z różnych struktur mózgowych szczura.

W aspekcie wykonawczym praca zasługuje na najwyższe uznanie. Zastosowane modele badawcze i techniki analityczne, pozwoliły na uzyskanie obiektywnych i wiarygodnych wyników umożliwiających pełną ocenę wpływu atypowych neuroleptyków na aktywność i ekspresję CYP450 w wątrobie i mózgu. Część doświadczalna została bardzo dobrze zaplanowana i przejrzysto opisana.

Uzyskane *wyniki* poddano dokładnej analizie statystycznej i przedstawiono w postaci tabel, rycin i opisów. Tabele i ryciny zostały zebrane w jednym rozdziale X i dołączone do rozprawy w postaci załącznika, co bardzo ułatwia lekturę tej części pracy. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki są oryginalnym i interesującym wkładem Autora w rozszerzenie wiedzy na temat mechanizmów interakcji i regulacji pomiędzy badanymi neuroleptykami a enzymami CYP450, które metabolizują wiele leków stosowanych w codziennej praktyce klinicznej. Efekty tych badań mogą być wykorzystane w terapii w celu zwiększenia jej skuteczności i bezpieczeństwa, zwłaszcza u pacjentów z innymi chorobami towarzyszącymi schizofrenii.

Dyskusja w przedstawionej do oceny pracy świadczy o znakomitej wiedzy Autora w zakresie zagadnień będących przedmiotem rozprawy doktorskiej. Omówienie wyników uzyskanych w poszczególnych modelach doświadczalnych jest logiczne i rzeczowe. Autor przeprowadził szczegółową analizę swoich badań, konfrontując je z badaniami innych zespołów badawczych. Na podkreślenie zasługuje podsumowanie zawarte w rozdziale *Dyskusja* i obrazowe przedstawienie mechanizmów wpływu badanych neuroleptyków na wątrobowy i mózgowy cytochrom P450. Autor uważa, że uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań na poziomie molekularnym, które pozwoliłyby wskazać nowe aspekty działania farmakologicznego neuroleptyków w centralnym układzie nerwowym. Podsumowaniem przeprowadzonych badań jest sześć wniosków, które wynikają bezpośrednio z analizy uzyskanych wyników.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Rozprawa została przygotowana niezwykle starannie, w oparciu o najnowszą literaturę, w sposób świadczący o dużej wiedzy dotyczącej przedmiotu zainteresowań Autora. Należy podkreślić, że rozprawa została napisana poprawną polszczyzną. W tak obszernym

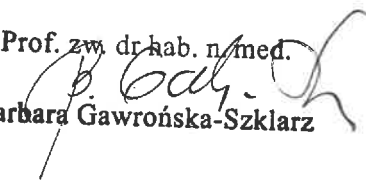
opracowaniu znalazłam jedynie pojedyncze błędy literowe oraz określenia, które często wynikają z bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego np.: str. 17 - fenytoiny a nie fenytioiny, działanie *represyjne* na aktywność receptora PXR – str. 23, kancerogeneza a nie karcenogeneza str. 25, poprawne jest określenie ilość, stężenie leku a nie poziom leku, czy wyższy poziom enzymu lub hormonu (str.30), sertindol a nie sertindon - str. 39, haloperidol a nie haloperidon.

Podsumowanie

Rozprawę doktorską Pana magistra Przemysława Danka oceniam bardzo wysoko, a wspomniane przez mnie uwagi, głównie natury redakcyjnej, nie obniżają wartości ostatecznej rozprawy. Badania, które były przedmiotem rozprawy doktorskiej zostały wykonane w ramach 2 projektów finansowanych ze środków NCN. Autor rozprawy był kierownikiem 1 projektu. Potwierdzeniem wartości naukowej uzyskanych wyników jest siedem publikacji w renomowanych czasopismach naukowych, których Doktorant jest współautorem.

Stwierdzam, że praca doktorska ma dużą wartość poznawczą, a uzyskane wyniki mogą być wykorzystane w praktyce klinicznej. Pan mgr Przemysław Danek wypełnił wszystkie zadania postawione w celu rozprawy. Wykazał się znakomitą wiedzą teoretyczną w reprezentowanej dziedzinie, przygotowaniem metodycznym w zakresie podjętych badań oraz umiejętnością analizowania wyników i wyciągania wniosków. Jego rozprawa doktorska stanowi oryginalny wkład w dziedzinę badań na temat interakcji nowych atypowych neuroleptyków z cytochromem P450. Uważam, że praca stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych, o czym świadczy opublikowanie uzyskanych wyników w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Rozprawa doktorska mgr. Przemysława Danka w pełni odpowiada warunkom określonym w art.13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr. Przemysława Danka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej oraz dorobek naukowy Doktoranta, stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr. Przemysława Danka (wniosek w załączeniu).

Szczecin, 29 kwiecień 2022 r.

Prof. zw. dr hab. n.med.

Barbara Gawrońska-Szklarz

Wniosek

o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Przemysława Danka

Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Przemysława Danka pt.: "Interakcje nowych atypowych neuroleptyków z cytochromem P450". Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest doskonałym przykładem kompleksowego podejścia do wyjaśnienia mechanizmów wpływu atypowych neuroleptyków na aktywność i ekspresję CYP450 w wątrobie i mózgu. Prezentuje wysoki poziom merytoryczny, wpisuje się w światowe trendy związane z badaniami nad poznaniem mechanizmów interakcji pomiędzy lekami przeciwpsychotycznymi a cytochromem P450. Uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne osiągnięcie naukowe Autora. Mają one nie tylko znaczącą wartość naukową, ale także praktyczną. Mogą być wykorzystane w praktyce klinicznej. O wadze uzyskanych wyników świadczą prace opublikowane na podstawie tej rozprawy, w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z listy filadelfijskiej, których Doktorant jest współautorem. Sumaryczny Impact Factor tych publikacji wynosi 32,581. W 6 publikacjach mgr. Przemysław Danek jest pierwszym, a w jednej drugim Autorem. Badania będące tematem rozprawy doktorskiej zostały wykonane w ramach 2 projektów naukowych finansowanych przez NCN. Mgr Przemysław Danek był kierownikiem jednego projektu.

Publikacje naukowe, które powstały na podstawie przeprowadzonych badań:

1. Wójcikowski J., Danek P. i wsp. In vitro inhibition of human cytochrome P450 enzymes by the novel atypical antipsychotic drug asenapine: a prediction of possible drug-drug interaction. *Pharmacol Rep* 2020, 72, 612-621. (IF=3,027)
2. Danek P. i wsp. The atypical neuroleptics iloperidone and lurasidone inhibit human cytochrome P450 enzymes in vitro. Evaluation of potential metabolic interactions. *Pharmacol Rep* 2020, 72, 1685-1694. (IF=3,027)
3. Danek P. i wsp. Asenapine and iloperidone decrease the expression of major cytochrome P450 enzymes CYP1A2 and CYP3A4 in human hepatocytes. A significance for drug-drug interactions during combined therapy. *Toxicol Appl Pharmacol* 2020, 406, 115239. (IF=4,219)
4. Danek P. i wsp. The influence of long-term treatment with asenapine on liver cytochrome P450 expression and activity in the rat. The involvement of different mechanisms. *Pharmaceuticals (Basel)* 2021, 14, 629. (IF=5,863)

5. Danek P. iwsp. The effect of chronic iloperidone treatment on cytochrome P450 expression and activity in the rat liver: involvement of neuroendocrine mechanisms. Int J Mol Sci 2021, 22, 8447. (IF=5,924)
6. Danek P. iwsp. Chronic treatment with asenapine affects cytochrome P450 2D (CYP2D) in rat brain and liver. Pharmacological aspects. Neurochem Int 2021, 151, 105209. (IF=3,921)
7. Danek P. iwsp. Long-term treatment with atypical antipsychotic iloperidone modulates cytochrome P450 2D (CYP2D) expression and activity in the liver and brain via different mechanisms. Cells 2021, 10, 3472. (IF=6,6)

Powyższe osiągnięcia upoważniają mnie do wystąpienia wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Przemysława Danko pt.: "Interakcje nowych atypowych neuroleptyków z cytochromem P450".

Szczecin, 29kwiecień 2022 r.

Prof. zw. dr hab. n. med.

Barbara Gawrońska-Szklarz