

Gdańsk, 08.05.2022

Ocena rozprawy doktorskiej:

mgr Przemysław Danek

pt. „Interakcje nowych atypowych neuroleptyków z cytochromem P450”

Wstęp

Nadrodzina białek cytochromu P450 to wielofunkcyjna i występująca we wszystkich organizmach żywych grupa hemoprotein enzymatycznych, które wykazują aktywność monooksygenaz. Ich uniwersalność stanowi jednak problem, ponieważ z jednej strony występują w wielu postaciach trudnych do wyizolowania metodami fizykochemicznymi, z drugiej zaś ich zdolności katalityczne są bardzo szerokie. Katalizują przemiany związków endogennych takich jak cholesterol, steroidy, związki o właściwościach hormonów czy witamin, ale także biorą udział w przemianach ksenobiotyków, jakimi są leki, katalizując też przemiany związków toksycznych, w tym kancerogennych. Rola cytochromów P450 w organizmach wyższych została dość dobrze poznana w aspekcie katalizowanych przez nie przemian zachodzących w wątrobie, dużo mniej doniesień znamy o roli tych enzymów w innych częściach organizmu, w tkankach jelit, nerek czy płuc. Natomiast przedmiotem niniejszej pracy jest bardzo słabo poznana funkcja i aktywność enzymów P450 występujących w tkance mózgowej, których zmiany aktywności obserwuje się pod wpływem atypowych leków neuroleptycznych.

Praca zrealizowana została w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie, w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków kierowanym przez prof. dr hab. Władysławę Annę Daniel. Profesor Daniel jest wraz z prof. dr hab. Wojciechem Piekoszewskim z Wydziału Chemii UJ promotorem pracy doktorskiej Pana Przemysława Danka. Przedmiotem badań Zakładu Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków są leki przeciwdepresyjne i neuroleptyczne w aspekcie ich przemian metabolicznych zachodzących z udziałem cytochromów P450. Ważnym elementem programu badawczego Zespołu jest również kierunek jakby odwrotny: wpływ leków neuroleptycznych na zmiany aktywności enzymów P450 i to zarówno w wątrobie jak i w mózgu. Jest to szczególnie ważne w aspekcie długotrwałego podawania leków pacjentowi, z czym mamy do czynienia w przypadku leków psychotropowych. Ale ważne jest również ze względu na indukowane na tej drodze zmiany metabolizmu substancji endogennych, takich jak neuroprzekaźniki czy steroidy.

Charakterystyka pracy

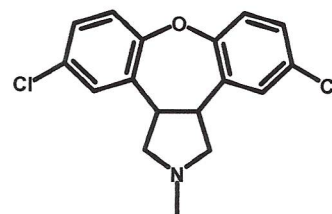
W świetle powyższych prac Zespołu celem rozprawy doktorskiej Pana Przemysława Danka było według Autora „...zbadanie wpływu atypowych neuroleptyków: asenapiny, iloperidonu i lurasidonu

na aktywność oraz ekspresję cytochromu P450 w mózgu i wątrobie.” Tak sformułowany cel został przedstawiony w rozdziale *Streszczenie*. Natomiast w rozdziale *Cel pracy* zostały wyszczególnione kolejne cele aż do piątego. Doktorant rozpoczął badania od możliwości bezpośredniego hamowania enzymu P450 w ludzkiej wątrobie. Dalej określił wpływ związków na aktywność i ekspresję badanych enzymów w hodowli komórek ludzkich hepatocytów po ich ekspozycji na lek przez 72 godziny. Kolejno zbadano bezpośredni wpływ badanych neuroleptyków na aktywność wybranego izoenzymu CYP2D w organizmie szczura (wątroba i mózg). Dla uwzględnienia specyfiki warunków terapii z udziałem neuroleptyków, czyli chronicznego podawania, zmiany aktywności i ekspresji cytochromów P450 pod wpływem tych leków zbadano również w warunkach przedłużonego dawkowania do 2 tygodni i to zarówno w wątrobie (CYP1 – CYP3), jak i w mózgu (CYP2D). W efekcie końcowym wskazano, że badane leki mogą modyfikować swoje własne działanie farmakologiczne poprzez wpływ na mózgowe enzymy CYP2D, co może korzystnie wpływać na leczenie schizofrenii.

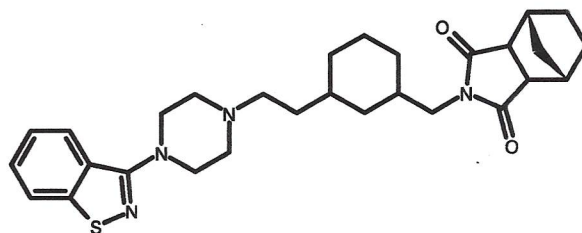
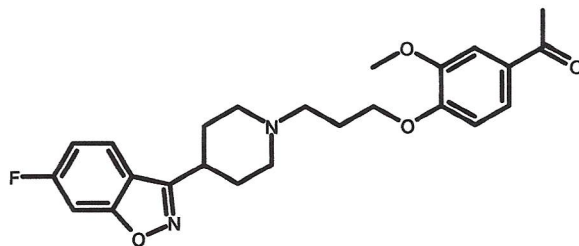
Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera 134 strony maszynopisu, w tym 24 strony odnośników literaturowych zawierających 284 pozycji oraz dwie ostatnie strony wymieniające źródła finansowania oraz listę 7 artykułów publikujących wyniki niniejszej pracy. Tekst pracy podzielony jest na 10 rozdziałów, przy czym pierwszy stanowi *Wstęp teoretyczny* wprowadzający czytelnika w świat cytochromów P450 w aspekcie nie tylko ich roli jako katalizatorów przemian metabolicznych leków, ale również jako odbiorców efektów indukowanych przez leki przeciwpsychotyczne. Rozdział drugi uzasadnia wielopłaszczyznowy przedstawiony powyżej *Cel pracy* oparty na funkcjach katalitycznych i regulatorowych cytochromów P450. Trzecia, obszerna część zawierająca 35 stron, to *Materiały i metody* wraz z opisem poprawnie zastosowanych metod statystycznej analizy wyników. Kolejny, ważny element pracy to *Wyniki* (10 stron) i ich *Dyskusja* (21 stron) oraz krótko i precyzyjne sformułowane *Wnioski* jako szósty rozdział pracy. Przyswojenie wyników bardzo obszernego zakresu badań pracy doktorskiej bardzo ułatwia precyzyjnie napisane trójstronicowe *Streszczenie*. Na końcu ogólnej charakterystyki pracy chciałabym skomentować umieszczenie ilustracji do części *Wyniki* w oddzielnej dodatkowej części. Jako czytelnik mam wątpliwości, dlaczego rysunki nie ilustrują bezpośrednio tekstu, tylko umieszczone zostały jako załącznik. Z drugiej strony wykresy kinetyki reakcji wykonane zostały bardzo solidnie i taki układ daje szerokie możliwości porównań. Szczególnie cenne w załączniku są tabele 1-4 podsumowujące wyniki i te zdecydowanie umieściłabym w tekście głównym, gdyż bardzo dobrze go uzupełniają. Zabrakło mi też rysunków struktur badanych związków oraz ilustracji (rysunki, schematy, wykresy) w długiej części *Dyskusja* (jeden rysunek, str.99). W sumie, Autor przeprowadził wielokierunkowe badania, na różnych „poziomach” biologicznych przedstawione jako „modele” w częściach *Wyniki* oraz *Dyskusja*,

Otrzymane wyniki

Wyniki będące przedmiotem pracy zawarte w rozdziale IV przedstawiają analizę wpływu nowych, atypowych leków neuroleptycznych o zróżnicowanych strukturach chemicznych i często skomplikowanych mechanizmach działania na przemiany metaboliczne katalizowane przez enzymy cytochromu P450. I tak asenapina, będąca pochodną dibenzoksepinopirołu ma wielokierunkowy mechanizm działania: jest antagonistą zarówno receptorów dopaminergicznych, D₁₋₄, jak i serotoninergetycznych, 5-HT₂, nie ma natomiast znaczącego powinowactwa do receptorów β-adrenergicznych. Jej złożony mechanizm działania ukierunkowany na receptory neuroprzekazników o różnym powinowactwie daje wyjątkowe właściwości psychoterapeutyczne wobec schizofrenii i



podobnych zaburzeń. Kolejny badany lek, iloperidon, to pochodna piperydyny z podstawnikiem fluorobenzizoksazolu zawierająca kilka reaktywnych grup podatnych na metabolizm głównie z udziałem CYP2D6 wprowadzającym grupę hydroksylową przy karbonylowej, natomiast CYP3A4 odpowiada za produkty demetylacji. Trzecim z leków badanych jest lurasidon, czyli pochodna azapironu z pierścieniem norbornanu i cykloheksanu. Taka struktura pozwala na leczenie objawów schizofrenii i choroby afektywnej dwubiegunowej poprzez mechanizm podobny jak w przypadku dwóch poprzednich leków, gdyż lurasidon również wykazuje antagonizm wobec receptorów dopaminergicznych D_2 i serotoninergicznych $5-HT_{2A}$. Co więcej, analiza struktury wskazuje na szerokie możliwości metabolizmu poprzez hydroksylację pierścieni alifatycznych, oksydacyjną N-dealkilację, a nawet S-oksydację czy rozszczepienie pierścienia izotiazolowego. Takie szlaki metaboliczne mogą bardzo modyfikować działanie lurasidonu w stosunku do dwóch poprzednich leków.



Wykazano wcześniej w Zespole Pani Profesor Daniel, że wiele neuroleptyków bezpośrednio hamuje aktywność białek P450 z rodziny CYP2D zarówno w wątrobie szczura jak i człowieka (Daniel 2005b) ale również z rodzin CYP3A i CYP1A (Wójcikowski i wsp., 2010, 2012). Natomiast badania Doktoranta rozpoczęły się od modelu I czyli analizy bezpośredniego wpływu trzech przedstawionych powyżej leków na aktywność P450 w mieszaninie ludzkich enzymów mikrosomalnych z wątroby oraz rekombinantowych enzymów CYP o znanej ekspresji. W obecności asenapiny wyróżniało się hamowanie CYP1A2 i CYP2D6, natomiast iloperidon w słabszym stopniu hamował CYP1A2, ale silne było hamowanie CYP3A4, CYP2D6 oraz CYP2C19. Szerokie spektrum hamowania aktywności P450 wykazał lurasidon wobec głównych izoenzymów z rodzin CYP1, CYP2 i CYP3, przy czym wyraźne słabsze działanie hamujące zaobserwowano dla CYP2D6. Generalnie badane związki działały w ten sam sposób wobec badanych izoenzymów, przy czym np. CYP2D6 wykazał kompetycyjny mechanizm hamowania.

Model II zastosowany w pracy, ludzkie hepatocyty, po określeniu cytotoksyczności leków wobec tych komórek pozwolił wskazać, że asenapina istotnie obniżyła aktywność CYP1A2, nie wpływając na pozostałe izoenzymy. Iloperidon natomiast hamował tylko aktywność CYP3A4, a lurasidon nie miał wpływu na badane izoenzymy w hepatocytach. W modelu III zastosowane zostały obok szczurzych mikrosomów komórek wątroby, mikrosomy komórek mózgu pochodzące od tych samych zwierząt. Oba typy komórek porównano pod względem możliwości wpływu badanych leków neuroleptycznych na aktywność enzymów z rodziny CYP2D, ponieważ enzymy te uczestniczą w syntezie ważnych neuroprzekaźników (dopamina, serotonina) i w metabolizmie neurosteroidów. Wyniki wskazały, że badane leki były dobrymi inhibitorami CYP2D w wątrobie, ale dużo słabszymi w komórkach mózgu.

Przyjęty przez Doktoranta model badań IV i V miał na celu przeprowadzenie doświadczeń w warunkach, w jakich zwykle stosowane są leki neuroleptyczne, czyli podczas chronicznego, dwutygodniowego podawania. W IV etapie zbadano zmiany stężenia w wątrobie szczura, natomiast w V, w mózgu tych zwierząt. W doświadczeniach modelu IV, w przypadku asenapiny nastąpił istotny spadek aktywności CYP1A i CYP2B, dużo słabszy w przypadku CYP2C11 i CYP3A, włączając w to

CYP2D. Podobne zahamowanie aktywności w około 30% indukował też iloperidon wobec CYP1A i CYP2B i w około 20% wobec CYP3A. Ważny w biosyntezie neuroprzekaźników CYP2D obniżył swoją aktywność w tych warunkach też o 30%. Poza tym Autor wskazał istotną informację, że asenapina silniej obniżyła poziom białek CYP1A i CYP2D niż ich aktywność enzymatyczną. Natomiast dużo słabsze obniżenie poziomu białek P450 i ich aktywności zaobserwowano u zwierząt po podaniu iloperidonu. W Tabeli 3 zwraca uwagę fakt, że tylko CYP2E1 ulegał pod wpływem iloperidonu podwyższeniu aktywności enzymatycznej i ekspresji białka do około 140% kontroli. Ostatni etap pracy, model V, stanowi spektakularne zakończenie badań relacji neuroleptyk/aktywność P450, szczególnie gdy dotyczy to rodziny CYP2D zawierającej neuroprzekaźniki. Chroniczne podawanie przez 2 tygodnie badanych neuroleptyków indukowało zmiany aktywności CYP2D w różnych strukturach mózgu, które mają znaczenie zarówno w schizofrenii jak i w efektach działania leków psychotropowych. Asenapina powodowała np. obniżenie aktywności CYP2D w mózdku oraz korze frontalnej i przeciwnie indukowała wyższą aktywność w prążkowie, podobnie jak iloperidon do 180%. Oba leki nie indukowały natomiast zmian aktywności tego enzymu w pniu mózgu, w podwzgórzu oraz tzw. reszcie mózgu.

Trudno o krytyczne uwagi przy tak szerokim zakresie badań i wielu zastosowanych modelach przemian metabolicznych, przy jednoczesnej perfekcji eksperymentalnej. Ale wiedza p. Danki w tym zakresie zmobilizowała mnie do dodatkowego pytania. Gdyby nie było możliwości zastosowania modeli *in vitro* z grupy od I do III, jakie inne układy eksperymentalne zastosowałby Autor, aby równie dobrze zrealizować cel pracy w jej pierwszej części? Czy udałoby się znaleźć wiele takich możliwości?

Dyskusja wyników i Wnioski

Bardzo szczegółowo opisane wyniki (10 stron) wspiera bardzo długa ich dyskusja (21 stron). Wyniki modelu I pozwoliły Autorowi na cenne wnioski, ale giną one np. w pierwszej części dyskusji, gdzie na str. 80 dwa razy opisane są efekty hamowania aktywności enzymów P450, w pierwszym akapicie jako jakościowe, a w następnym ilościowe dla poszczególnych leków. W moim odczuciu poprzez cytowanie danych liczbowych giną ważne wnioski, jak np. ten, na str. 80, że asenapina jest zarówno substratem jak i inhibitorem CYP1A2 i CYP2D6. Skróciłabym też w dyskusji drugi akapit ze str. 82 i pominęłabym pierwszy na str. 83. W takiej sytuacji wyraźniej zwrócą uwagę dwa ostatnie akapity opisujące konsekwencje przewlekłego podawania pacjentom badanych trzech leków. Hamowanie przez nie aktywności enzymów P450 może bowiem indukować interakcje metaboliczne z innymi lekami, np. asenapiny lub iloperidonu z substratami CYP2D6 lub CYP3A4. Uzyskane na tym etapie wyniki wskazują też na rolę wybranych enzymów P450 w biotransformacji substancji endogennych (estradiol, neurosteroidy, progesteron, testosteron) i zanieczyszczeń środowiska.

Podobnie, w modelu II, wyniki z ludzkich hepatocytów skomentowane zostały w pracy bardzo szeroko, podczas gdy zwróciłabym uwagę tylko na kilka spraw. Po pierwsze, pominęłabym trzy akapity ogólnego wstępu ze str. 84, pozostając tylko przy uzasadnieniu na str. 85, dlaczego zastosowano pierwotne ludzkie hepatocyty. Natomiast jakie modele badań i modele kontrolne zastosowano jest opisane wcześniej w części *Wyniki*. Rzeczywistą *Dyskusję* stanowi dopiero drugi akapit, str. 86, wskazujący, że długotrwała terapia asenapiną i iloperidonem zmieniają aktywność i ekspresję genów CYP1A2 i CYP3A4 w hepatocytach. Ten etap badań pozwolił na wniosek, że np. asenapina wpływa istotnie hamująco na CYP1A2, a iloperidon na CYP3A4, na drodze dwóch różnych mechanizmów: hamowanie aktywności białka enzymatycznego i hamowanie ekspresji jego genu.

Trudno natomiast mieć zastrzeżenia do dyskusji wyników dotyczącej modelu III, gdzie badano zmianę aktywności CYP2D w mikrosomach komórek mózgu i wątroby szczura pod wpływem stosowanych leków. Otrzymane wyniki są od razu przedyskutowane, poprzez porównanie z otrzymanymi poprzednio, w aspekcie powinowactwa leku do centrum aktywnego i w aspekcie znaczenia farmakologicznego. Podjęto też próbę wyjaśnienia obserwowanych różnic pomiędzy mózgiem i wątrobą w bezpośrednim hamującym działaniu leków. Poza „klasyczną” propozycją sposobu oddziaływania z miejscem aktywnym enzymu, uwzględniono też zawartość fosfolipidów w mózgu, co daje możliwość niespecyficznego wiązania badanych leków o właściwościach lipofilowych.

Kolejny, Model IV, różni się od pozostałych tym, że: (i) uwzględnia efekty chronicznego podawania wybranych neuroleptyków i (ii) stosuje model zwierzęcy, wątrobę szczura. Charakterystyka tego modelu jest bardzo szeroka i merytoryczna, trudno usunąć, którykolwiek akapit, ponieważ każdy jest zwięźle napisany. Autor kolejno opisuje, co dzieje się w organizmie żywym w wątrobie po chronicznym, 14-dniowym podaniu leków. I tak obserwowane pod wpływem asenapiny i iloperidonu obniżenie transkrypcji genu *CYP2D* porównane jest z tym, obserwowanym wcześniej w Zespole pod wpływem neuroleptyku risperidonu czy sulpirydu. Mechanizmy transkrypcyjne *CYP2D* w wątrobie dyskutowane są też szerzej, jako dotychczas słabo poznane. Na podstawie wyników własnych i doniesień literaturowych Autor podjął też dyskusję nad zachodzącym z udziałem hormonu wzrostu i ksenobiotyków mechanizmem regulacji genów *CYP1A*, *CYP2B*, *CYP2C* lub *CYP3A* z udziałem m.in. receptorów PXR, CAR i RXR. Wskazał też, że obniżenie ekspresji genów *CYP2B*, *CYP2C11* i *CYP3A* może między innymi wynikać z szybszego wydzielania hormonu wzrostu i hormonów tarczycy. Poza tym oba badane leki mogą, jako antagoniści receptora 5-HT_{2C}, prowadzić do negatywnej regulacji w/w enzymów. Zwraca też uwagę, wspomniany w *Wynikach*, nietypowy wpływ iloperidonu i asenapiny na ekspresję *CYP2E1*. Jego aktywność i ekspresja uległa bowiem podwyższeniu pod wpływem leków, co Autor tłumaczy, między innymi, specyficzną rolą *CYP2E1* w metabolizmie egzogennych związków niskocząsteczkowych takich jak aceton czy etanol.

Dla pełnego opisu wpływu chronicznego podania neuroleptyków na enzymy CYP2D Autor dołączył w modelu V badania dotyczące struktur mózgu szczura, jako głównego celu ich działania i miejsca metabolizmu. Charakterystyczną cechą dla tego modelu jest różnica efektów podania asenapiny i iloperidonu w zależności od regionu mózgu, ale także często różnice pomiędzy lekami. Przy różnej dystrybucji enzymu CYP2D w mózgu, zmienia się lokalny poziom leku w różnych jego obszarach, co może też różnie wpływać na lokalną aktywność enzymów. Obniżenie aktywności CYP2D w strukturach mózgu przez badane leki może np. przyczynić się do wzrostu stężenia neurosteroidów, mając wpływ na farmakologię tych leków. Podsumowując, nowe badane leki wpływając na CYP2D w mózgu będą wpływać na mózgowy metabolizm leków, ale też substancji endogennych w sposób inny niż w wątrobie, co w końcowym efekcie może mieć korzystny wpływ na efekty leczenia schizofrenii.

Elementem istotnym rozdziału pracy *Dyskusja* jest ostatnia jej część (str.97) będąca zwięzłym podsumowaniem opisanych powyżej osiągnięć Doktoranta. Jest to krótki tekst, ale pełen treści, zawiera też (jedyne) schemat ilustrujący przeprowadzone badania i stanowi bardzo dobry element zakończenia pracy. Co więcej, zawiera też wynikające z pracy plany dalszych badań. Autor proponuje analizę wpływu badanych leków między innymi na ekspresję receptorów jądrowych (PXR, CAR, RXR) będących regulatorami cytochromów P450, ale też innych białek. Jest to zagadnienie niezwykle istotne w aspekcie nowych wyników z zakresu długotrwałego podawania badanych i innych leków działających w centralnym układzie nerwowym.

Wobec powyższego inną rolę pełni rozdział *Wnioski* (str.100). Po podsumowaniu przedstawionym wcześniej w dyskusji, rozdział ten ma inny charakter. Można powiedzieć, że bardziej formalnie skupia się na opisanu otrzymanych wyników w kontekście sposobu działania nowych atypowych neuroleptyków wobec enzymów cytochromu P450 w różnych badanych modelach. Autor wskazuje na końcu, że wobec otrzymanych wyników badane leki mogą jednocześnie modyfikować swoje własne działanie farmakologiczne.

Edycja pracy

Elementem wyróżniającym niniejszej pracy jest bardzo staranny opis wyników i edycja pracy. W załączniku umieszczono 38 rysunków ilustrujących część *Wyniki*. Są to zarówno wykresy kinetyczne jak i schematy słupkowe, które wszystkie wykonane zostały bardzo starannie. Zestaw uzupełniają 4 tabele, które, jak wspomniałam powyżej, umieściłabym w głównym tekście pracy, podobnie jak wybrane rysunki. W mojej opinii ułatwiłoby to szybka analizę wyników podczas czytania pracy. Jednocześnie jakość rysunków wskazuje na kompetencje Doktoranta w zakresie metod opracowywania i analizy wyników.

Tekst pracy doktorskiej zawiera bardzo mało błędów edytorskich typu braku liter czy pomyłki w tekście, dlatego pominię ich wyliczanie. Zamieniłabym jedynie przymiotniki „hydrofilny” na „hydrofilowy” i „lipofilny” na „lipofilowy” a rzeczownik „użycie” czy „wykorzystanie” na „zastosowanie” (np. str 98, 100).

Wnioski końcowe

Podsumowując, pomimo wskazanych powyżej drobnych uwag, bo o poważne merytoryczne wątpliwości wobec prezentowanej pracy doktorskiej bardzo trudno reprezentuje ona bardzo wysoki poziom przeprowadzonych badań i szeroki ich zakres oraz bardzo precyzyjny opis wyników.

Stwierdzam, że rozprawa Pana Przemysława Danka pt. „*Interakcje nowych atypowych neuroleptyków z cytochromem P450*” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym i przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pana mgr Przemysława Danka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie

Jednocześnie, ze względu na bardzo szeroki zakres badań przedstawiony w pracy i opisaną powyżej wartość otrzymanych wyników oraz fakt opublikowania większości z nich w 7 publikacjach o IF od 3 do 6 wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie

o **wyróżnienie pracy doktorskiej** Pana mgr Przemysława Danka

pt. „*Interakcje nowych atypowych neuroleptyków z cytochromem P450*”.


Prof. dr hab. inż. Zofia Mazerska