



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Farmakodynamiki

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Magdalena Bujalska-Zadrożny
Zakład Farmakodynamiki
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Ul. Banacha 1b
02-097 Warszawa

Warszawa, 20.05.2022r.

RECENZJA

Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu Pana mgr farm. Adriana Bryły pt. „Ocena aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej analogów związku HC-030031” wykonanej w Zakładzie Wstępnych Badań Farmakologicznych Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem Pani dr hab. n. farm. Małgorzaty Zygmunt.

Zwalczanie bólu, w szczególności bólu neuropatycznego (BN) wciąż stanowi niedostatecznie zbadany problem kliniczny, ponieważ jego podstawy patofizjologiczne są złożone, a jednocześnie w zależności od rodzaju bólu odmienne.

Ze względu na często niedostateczne działanie nawet uznawanych za najsilniejsze klasycznych środków analgetycznych (przykładowo - słabe działanie opioidów w bólu neuropatycznym), bardzo cenne jest poszukiwanie nowych związków i strategii terapeutycznych, wykorzystujących stopniowo odkrywane mechanizmy.

Jak wiadomo, podłoże procesów patofizjologicznych związanych tak z bólem w ogóle, jak i bólami neuropatycznymi jest w sposób nieodzowny związane z istnieniem i działaniem różnego rodzaju kanałów jonowych/receptorów. Wynika to z podstawowej zasady przekazywania informacji bólowej (szerzenie się potencjału czynnościowego).

W ostatnich kilkunastu latach napływa coraz więcej doniesień o udziale w mechanizmach związanych z bólem kanałów wbudowanych w znane od przełomu lat 70 i 80 XX wieku receptory z grupy TRP, tzw. receptory przejściowego potencjału. Od lat wiadomo o analgetycznym działaniu w bólu neuropatycznym kapsaicyny - stosowanego w leczeniu agonisty receptora wanilloidowego TRPV1. Poza podgrupą TRPV1, jako potencjalnie istotne klinicznie w łagodzeniu bólu rozpatruje się także podgrupy TRPV2, TRPV3 oraz TRPM8, a także TRPV4 i **TRPA1**.

Z powyższych względów podjęte przez Doktoranta zagadnienie zbadania aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej analogów związku HC-030031 będącego selektywnym antagonistą kanału jonowego TRPA1 uważam za ważne i aktualne. TRPA1 ma istotne

znaczenie w mechanizmach bólu (w tym opornego na leczenie bólu neuropatycznego) oraz mechanizmach rozwoju stanów zapalnych.

Rozprawa doktorska pana Adriana Bryty obejmuje 104 strony maszynopisu proporcjonalnie podzielone na część teoretyczną i doświadczalną; w pracy zachowane są tradycyjne elementy opisu gwarantujące łatwy dostęp do pożądaných informacji. Na pochwałę zasługuje fakt, że maszynopis pracy jest zaopatrzony w sumie aż w 26 ułatwiających rozumienie tekstu ilustracji, w tym osiem rycin oraz 18 wykresów, a także 18 tabel, z których 13 przedstawia wyniki badań wykonanych przez Autora.

Pierwszy rozdział pracy stanowi **wykaz użytych skrótów** (str. 5-6). W tej części zwraca uwagę niekompletność wykazu - brak np. akronimów rozwiązanych w różnych miejscach tekstu, takich jak DPPH, FRAP, MDA, MPEP, jednak wg oceny recenzującego takie skróty jak np. ASA, BSA, EP/EPR, fluo-4, FPA/FPAR, FPB/FPBR, HEK-293, HEPES, Pluronic F -127, ROS, r-r czy w/v nie zostały w ogóle rozwiązane w całym tekście pracy

Wstęp Doktorant poświęcił przede wszystkim szeroko pojętym zagadnieniom związanym z bólem oraz procesami zapalnymi. W jednym z podrozdziałów Doktorant wymienia wachalarz teoretycznych możliwości łagodzenia bólu, które pojawiły się wskutek postępów badań nad mechanizmami nocycypcji w ostatnich latach; na końcu owego wykazu widnieje "kanał jonowy TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1)". Pozostałą część wstępu wypełnia dokładny opis najpierw receptorów przejściowego potencjału jako grupy, a następnie głównego przedmiotu zainteresowania pracy, czyli receptora ankyrinowego przejściowego potencjału TRPA1. Doktorant opisał także krótko działający antagonistycznie związek HC-030031 wskazując jednocześnie na jego zalety, w tym brak właściwości uzależniających czy też rozwoju tolerancji.

We wstępie pojawiły się drobne nieścisłości, np. "małe neurony" (dwukrotnie w tabeli 1 na s. 13) należałoby zastąpić przez "neurony o małej średnicy". W miejsce "kapaliny" (s. 11, pierwszy wiersz od dołu) powinno być "kalpainy". Lepszym zamiennikiem "wybuchu oddechowego" (s. 21) byłby "wybuch tlenowy", względnie "wybuch oksydacyjny"; tak określony proces obejmuje zresztą **nie** gwałtowne zużycie tlenu przez neutrofile jak pisze Autor, lecz gwałtowne uwolnienie tlenu przez te komórki (i inne, gdyż definicja wybuchu tlenowego jest szersza).

Opracowanie części teoretycznej rozprawy stanowi logiczny ciąg uzupełniających się informacji z podkreśleniem występujących w nim elementów nowości. Doktorant wykazał umiejętność krytycznego korzystania z piśmiennictwa naukowego oraz zdolność selekcji i właściwej segregacji danych w odniesieniu do podjętego tematu. Wraz z cytowaniem aktualnego piśmiennictwa wszystko to świadczy o dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktoranta do rozwiązywania podjętego zadania badawczego.

Cel pracy, którym była ocena aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej nowych analogów HC-030031 - selektywnego antagonisty kanału jonowego TRPA1 został sformułowany poprawnie.

Rozdział zatytułowany „**Materiały**” na początku wymienia fakt włączenia do badań 12 związków będących analogami HC-030031. Szkoda, że w tekście pracy nie podano pełnych

nazw chemicznych badanych analogów HC-030031 (co jednak warte pochwały, na ryc. 8 zamieszczono wzory wszystkich dwunastu związków).

Kolejna sekcja tej części pracy zatytułowana "3.2. Zastosowane leki i odczynniki" jest niekompletna - tylko przypadkowo recenzent zauważył brak choćby takich związków jak bufor HBSS, probenecyd czy pluronic F-127 (przydałoby się zresztą wyjaśnić w którymś miejscu dokładniej, czym jest ten ostatni związek). Jeśli podaje się producentów odczynników (co stanowi zwyczaj godny pochwały), to warto to uczynić dla wszystkich związków a nie tylko części z nich.

Czwarty rozdział pracy to „**Metodyka**”. W tej części Doktorant opisał szereg badań ukierunkowanych na stwierdzenie antynocyceptywnych lub/i przeciwzapalnych właściwości badanych analogów HC-030031. Wykorzystano do tego szereg testów/modeli doświadczalnych szeroko stosowanych w doświadczalnej farmakologii badań bólu. W badaniach na zwierzętach używano szczurów rasy Wistar i myszy rasy Swiss Albino.

W celu realizacji założeń pracy Doktorant przeprowadził badania o znacznym stopniu złożoności; warto zaznaczyć, że planując je uwzględniono także możliwość, iż ewentualnie stwierdzone antynocyceptywne i przeciwzapalne działanie analogów HC-030031 może wynikać także z przyczyn innych niż blokowanie kanału receptora TRPA1 (stąd kilka dodatkowych badań in vitro, np. oznaczenie całkowitej aktywności antyoksydacyjnej czy poziomu reaktywnych form tlenu). Uznanie budzi sposób zaprojektowania badań polegający m.in. na stopniowym zawężaniu kręgu badanych związków. Podejście takie pozwala m.in. oszczędzić wykonania niepotrzebnej pracy oraz ograniczyć wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych i odczynników. Opisy niektórych z zastosowanych technik (w szczególności oznaczanie wpływu na aktywność COX-1 [4.2.3] oraz na poziomy interleukin [4.2.8]) są nieco niejasne.

W poszczególnych modelach Autor stosował pozytywną kontrolę. W teście formalinowym i przeciągania był to kwas acetylosalicylowy (ASA), w modelu gorącej płytki morfina a w modelu obrzęku karageninowego ketoprofen. Co zaskakuje, w modelu neuropatii toksycznej nie użyto żadnej kontroli pozytywnej (proszę o wyjaśnienie). O ile w teście gorącej płytki z uwagi na charakter bólu i zastosowanego bodźca termicznego nie jest zaskoczeniem zastosowanie morfiny, proszę o wyjaśnienie, dlaczego w modelu karageninowym zdecydowano się na zastosowanie zamiast ASA innego NLPZ – ketoprofenu. Sposób doboru dawek kontroli pozytywnej wydaje się nieco przypadkowy, proszę wyjaśnić jak Doktorant dobrał dawki związków użytych jako kontrolne (czy uwzględniono fakt, że ilości związków stanowiących kontrolę wyrażone w molach powinny być adekwatne do tak samo wyrażonych ilości związków badanych?).

Pod względem doboru modeli doświadczalnych i realizacji badań część praktyczna rozprawy nie budzi zastrzeżeń. Zaskakuje jednak fakt braku badań skuteczności antynocyceptywnej badanych związków w modelu bólu zapalnego wywołanego podaniem karagenu (wykonano jedynie pomiary obrzęku łapy, czyli stanu zapalnego). Dlaczego Doktorant zrezygnował z takiego pomiaru?

Zwraca uwagę wiedza praktyczna Doktoranta, konieczna w celu przeprowadzenia wielu badań biologicznych o różnym charakterze - od badań aktywności związków aż po eksperymenty o charakterze behawioralnym.

W następnej części pracy "**Wyniki badań**" Doktorant dokonał szczegółowej analizy wyników przeprowadzonych badań. Zostały one poddane analizie statystycznej, a następnie przedstawione w trzynastu tabelach i zilustrowane osiemnastoma wykresami.

W badaniach podstawowych oceniających właściwości hamujące aktywność ludzkiego kanału TRPA1 z wykorzystaniem komórek HEK-293 wykazano, że jedynie siedem spośród dwunastu analogów HC-030031 wziętych do badań działa hamująco na ludzki kanał TRPA1, przy czym działanie silniejsze od HC-030031 (odnośnik) wywierają cztery związki. W teście formalinowym z kolei dziewięć z 12 badanych związków wykazało działanie antynocyceptywne, przy czym pięć z nich wykazywało działanie w obu fazach, natomiast cztery były aktywne tylko w II fazie testu. W teście przeciągania wszystkie 12 badanych związków wykazało działanie antynocyceptywne, choć w zróżnicowanym stopniu (najsilniej działał związek GR-870). W teście gorącej płytki działanie wydłużające czas reakcji na bodziec bólowy wykazało wg obliczeń recenzującego (nie napisano tego wprost) 9 związków, lecz było to działanie statystycznie nieznamienne (najsilniejsze w przypadku GRKA-11).

W modelu obrzęku karageninowego potencjalną aktywność przeciwzapalną wykazało dziewięć z 12 badanych związków.

W teście sprawdzającym wpływ na ruchliwość spontaniczną wszystkie 12 badanych związków zmniejszało ruchliwość spontaniczną zwierząt. Najsilniejsze działanie charakteryzowało związki GR-870 i GR-858.

Wyciągając wnioski, Doktorant do badań poszerzonych oceny działania w bólu neuropatycznym wykorzystał pięć z dwunastu związków (GRKA-12, MS-124, MS-134, GR-858 oraz GR-870). W teście von Frey'a, działanie łagodzące allodynię wykazano w przypadku wszystkich pięciu wymienionych związków. W kolejnym badaniu - teście zimnej płytki wzięto pod uwagę tylko dwa związki aktywne w teście von Frey'a (GR-858 i GR-870), przy czym wykazano statystycznie istotny wpływ badanych związków na próg reaktywności termicznej zwierząt, ale tylko w najwyższej dawce (10 mg/kg). Dlaczego w ocenie aktywności związków w teście zimnej płytki punktem odniesienia jest tylko jedna grupa kontrolna zaś pomiary badanych związków prowadzono kilkakrotnie (w fazie wczesnej jak i później)? Przy testach termicznych, np. zimnej lub gorącej płytki wyniki wyjściowe mogą się znacznie różnić chociażby ze względu na uczenie się zwierząt i świadome unikanie bodźca.

Kolejną część opisu wyników poświęcono badaniom sprawdzającym możliwość, iż ewentualnie stwierdzone przeciwbólowe/przeciwzapalne działanie analogów HC-030031 może wynikać (także) z przyczyn innych niż blokowanie kanału receptora TRPA1. Spośród siedmiu związków wybranych do badania wpływu na aktywność COX-1, aż sześć wykazało działanie hamujące ten enzym. Wpływ na peroksydację lipidów wywierały tylko dwa z siedmiu związków (GRKA-11 i GRKA-12), zaś wpływ na całkowitą aktywność antyoksydacyjną stwierdzono u sześciu z siedmiu przebadanych związków (metoda FRAP) lub jednego związku (metoda redukcji rodnika). W następnym badaniu poziom reaktywnych form tlenu był zmniejszany przez cztery na pięć badanych związków, jednak tylko w przypadku GR-870 wynik był statystycznie istotny. W ostatnim z opisywanych badań, czyli oznaczeniu wpływu badanych związków na poziomy interleukin (IL-1 β , IL-6) i TNF-alfa wykazano, że żaden z pięciu przebadanych związków nie obniżał w sposób statystycznie istotny poziomu wymienionych cytokin w homogenatach z łap mysich.

W tej części pracy zwraca uwagę umiejętność przedstawiania przez Doktoranta uzyskanych wyników. W ramach tego przy większości badań zamieszczono wykresy pozwalające na szybkie przyswojenie wyników poszczególnych eksperymentów.

W omawianym rozdziale należy także skorygować drobne nieścisłości. Z tabel 10 i 11 (str. 63) wynika, że w teście obrzęku karageninowego związkiem referencyjnym przy wyższych dawkach (20 mg/kg m.c.) związków badanych był ketoprofen i HC-030031, podczas gdy przy dawkach niższych (10 mg/kg m.c.) sam HC-030031, natomiast w opisującym to badanie tekście na str. 61 wspomina się tylko o ketoprofenu (należy skorygować te informacje). Dlaczego zabrakło jednej grupy odniesienia z ketoprofenem (tab. 11)? Na str. 76 najpierw stwierdza się, że całkowitą zdolność redukcji jonów żelaza zwiększały tylko hydrazydowe analogi HC-030031, po czym z kolejnego zdania wynika, że parametr ten zwiększały jednak także związki GR-858 i GR-872, tyle, że w mniejszym stopniu; należy tę nieścisłość skorygować.

W pierwszej części **dyskusji** Doktorant po przedstawieniu uwarunkowań uzasadniających celowość badań nad analogami związku HC-030031, skupił się na szerokim uzasadnianiu celowości testów zastosowanych w fazie eksperymentalnej zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Podkreśla się tu przesiewowy charakter testu formalinowego, testu gorącej płytki oraz testu przeciągania (w oryg. "testy skринingowe"). Drugim bardzo istotnym elementem jest analiza porównawcza, czyli wnioskowanie o właściwościach badanych związków przez zestawianie ze sobą i porównywanie wyników różnych testów wykonanych w odniesieniu do tej samej substancji. Przykładem może być ocena wpływu badanych związków na ruchliwość spontaniczną myszy w celu identyfikacji substancji działających sedatywnie, miorelaksacyjnie, względnie psychozomimetycznie i tym samym wykluczenia fałszywie pozytywnych wyników testu przeciągania. Dzięki tym rozważaniom Recenzent od razu skonfrontował swoje wątpliwości co do wyników opisujących działanie związków w modelu przeciągania. Dlaczego jednak silny wpływ badanych związków na ruchliwość spontaniczną nie mógłby powodować fałszywie pozytywnych wyników w innych modelach?

W omawianym rozdziale Autor wyjaśnia także celowość przeprowadzenia oznaczeń aktywności antyoksydacyjnej, wpływ na ilość cytokin oraz aktywność COX-1 w przypadku związków, które wykazały istotny efekt przeciwzapalny we wcześniejszych eksperymentach.

W dyskusji zwraca uwagę zdolność Doktoranta do wnikliwej analizy wyników oraz wnioskowania dotyczącego przyczyn obserwowanych zjawisk, a także szczegółowego uzasadniania przyjętych w pracy rozwiązań. Przykładem może być uzasadnienie, dlaczego w badaniach wykorzystano konkretne testy albo dlaczego dane badanie przeprowadzono na zawężonej grupie związków zamiast na wszystkich zakwalifikowanych na początku do badań.

Dyskusja została przeprowadzona poprawnie i uwzględniono w niej wszystkie ważniejsze wątki pracy.

Dyskusję zamyka część podsumowująca, w której Autor wymienia główne ustalenia pracy stwierdzając, że przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej badania działania przeciwbólowego i przeciwzapalnego analogów HC-030031 wykazały ich istotną aktywność w zwierzęcych modelach bólu i zapalenia. Autor wnioskuje, że działanie analgetyczne oraz przeciwzapalne większości badanych związków może wynikać z ich antagonistycznych właściwości w odniesieniu do kanału jonowego receptora TRPA1 lub COX-1. Istnieją także przypuszczenia, że związki te mogą hamować aktywność fosfodiesterazy PDE4/7, lecz pozostają one na razie w sferze hipotez.

Czy Doktorant planuje dalsze badania wyjaśniające potencjalne inne mechanizmy działania badanych związków jako celu terapeutycznego mogącego wspomóc zwalczanie bólu, w szczególności neuropatycznego?

Po zamknięciu dyskusji Doktorant sformułował (w rozdziale siódmym) dziesięć **wniosków** syntetycznie podsumowujących przeprowadzone badania.

Ósmy i dziewiąty rozdział pracy obejmują dwa **streszczenia** –w języku polskim a potem angielskim. Streszczenia te nie budzą istotnych zastrzeżeń merytorycznych.

Kolejny, dziesiąty rozdział rozprawy stanowi **wykaz piśmiennictwa**. Rozdział ten obejmuje 130 publikacji krajowych i zagranicznych uszeregowanych prawdopodobnie w kolejności pierwszorzadowego wystąpienia w tekście. Przegląd listy piśmiennictwa ocenianej rozprawy doktorskiej upewnia, że korzystano z najnowszych publikacji. Cytowane piśmiennictwo od 2020r. sięga wstecz aż do roku 1949 (poz. 117 wykazu) Tak szeroki dobór piśmiennictwa pośrednio potwierdza dobre teoretyczne przygotowanie Autora do podjętego zadania badawczego oraz wskazuje na posiadanie przez Doktoranta umiejętności krytycznego korzystania z piśmiennictwa naukowego, zdolności selekcji i właściwej segregacji danych w odniesieniu do podjętego tematu.

Merytoryczna strona rozprawy nie budzi wątpliwości. Niewątpliwie na uwagę zasługują prawidłowo zaplanowane i wykonane przez Doktoranta badania o wysokim stopniu trudności. Szereg badań zarówno in vitro jak i in vivo wskazuje na doskonałe manualne przygotowanie Doktoranta, umiejętność organizowania pracy badawczej, a także planowania i rozwiązywania zagadnień naukowych.

Pracę doktorską Pana mgr Adriana Bryły oceniam od strony merytorycznej pozytywnie. Podkreślam, że podjęta przez Doktoranta próba oceny przeciwbólowej i przeciwzapalnej aktywności nowych analogów związku HC-030031 kieruje uwagę naukowców na ich potencjalne wykorzystanie (w szczególności tych, które są antagonistami TRPA1) przynajmniej jako środków wspomagających znoszenie bólu, szczególnie neuropatycznego.

Przedstawiając powyższą ocenę, kieruję do Rady Dyscypliny Nauki farmaceutyczne Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pana mgr Adriana Bryły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Magdalena Bujalska-Zadrozny