

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr farm. KAROLINY FRĄCZEK

**pt. „OCENA AKTYWNOŚCI ANALGETYCZNEJ ORAZ WSTĘPNEGO PROFILU BEZPIECZEŃSTWA
ZWIĄZKU HYBRYDOWEGO OPIOID-NEUROTENSYNA”**

wykonanej w Zakładzie Farmakodynamiki

Wydział Farmaceutyczny Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Magdaleny Bujalskiej-Zadrozny (promotor)

oraz dr hab. n. med. i n. o zdr. inż. Patrycji Kleczkowskiej (promotor pomocniczy)

Synteza związków hybrydowych, określanych również jako wielofunkcyjne czy biwalentne, to nowoczesne podejście do racjonalnego projektowania leków, w którym nowe związki chemiczne uzyskuje się przez połączenie dwóch lub więcej farmakoforów pochodzących z różnych związków bioaktywnych w jedną cząsteczkę. Dzięki takiemu podejściu chemicy medyczni mają nadzieję, że nowa pochodna hybrydowa będzie posiadała większą skuteczność farmakologiczną w porównaniu z lekami/cząsteczkami macierzystymi, zmodyfikowany profil selektywności w stosunku do wybranych receptorów, poprawę właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych w porównaniu do związków macierzystych, większą siłę działania oraz mniejsze efekty niepożądane. To podejście zostało z powodzeniem zastosowane przez wiele grup badawczych na całym świecie i przyniosło bardzo obiecujące wyniki w projektowaniu leków do zwalczania chorób o profilach wieloczynnikowych, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, nowotwory, zapalenie czy nadciśnienie tętnicze.

Przedstawiona do oceny praca doktorska dobrze wpisuje się w nurt badań nad poszukiwaniem nowych leków do zwalczania bólu. Ból jest zjawiskiem o złożonym patomechanizmie, którego leczenie w wielu przypadkach jest niesatysfakcjonujące. Stosowane do tej pory leki, takie jest niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ)

czy opioidowe leki przeciwbólowe obdarzone są wieloma działaniami niepożądanymi. Zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w zwalczaniu bólu korzystne jest stosowanie terapii wielokierunkowej. Dlatego poszukiwanie leków o więcej niż jednym celu molekularnym wydaje się ze wszelkich miar pożądane.

Głównym przedmiotem badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Frączek była ocena aktywności biologicznej związku hybrydowego, oznaczonego symbolem PK23, łączącego wiązaniem peptydowym dwa farmakofory: analog opioidu oraz analog aktywnego fragmentu neurotensyny (NT₈₋₁₃). Związek zaprojektowano i zsyntetyzowano w Zakładzie Neuropeptydów Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. W pracy przebadano aktywność biologiczną tego związku, głównie pod kątem jego potencjału analgetycznego w różnych testach nocyceptywnych, jego profil bezpieczeństwa (parametry krążeniowo-oddechowe) oraz niektóre cechy jego farmakokinetyki (przenikalność przez barierę krew-mózg) u szczurów. Sformułowanie powyższych celów w ramach realizacji rozprawy doktorskiej uważam za ważne i ambitne zadanie, w pełni uzasadnione merytorycznie.

Przedstawiona do oceny praca jest monograficznym opracowaniem liczącym 155 numerowanych stron. Zawiera spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele i założenia pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusję (omówienie wyników). Praca zakończona jest wnioskami oraz piśmiennictwem w liczbie 322.

We Wstępie (str. 7-35) Doktorantka przedstawiła patomechanizm powstawania bólu, jego rodzaje oraz grupy leków przeciwbólowych stosowanych do jego zwalczania (drabina analgetyczna WHO). Następnie scharakteryzowała układ opioidowy, endogenne ligandy tego układu (peptydy opioidowe) i ich mechanizm działania. W tej części Wstępu omówione zostały również objawy niepożądane opioidów z uwzględnieniem tolerancji i tolerancji krzyżowej. Druga część Wstępu dotyczy układu neurotensynergicznego, neurotensyny i jej roli w zjawisku bólu. Natomiast część trzecia poświęcona jest wiedzy na temat tworzenia związków dimerycznych i bifunkcyjnych (hybryd). Podsumowując tą część rozprawy należy stwierdzić, że informacje zaprezentowane zostały w sposób czytelny, z uwzględnieniem najnowszych danych z piśmiennictwa. Uważam, że opracowanie to dobrze wyraża stosunek Doktorantki do aktualnego stanu wiedzy w obszarze, którego dotyczy rozprawa doktorska. Kolejny rozdział, Założenia i Cel pracy (str. 45-46), jest sformułowany jasno i wyczerpująco. Doktorantka przedstawiła tutaj szczegółowo zadania, które zaplanowała do realizacji założonych w pracy celów.

Rozdział materiały i metody (str. 47-69) obejmuje ogólne warunki przeprowadzenia doświadczeń oraz opis zastosowanych procedur. Ta część pracy doktorskiej została zaplanowana i przygotowana bardzo starannie. Opis procedur jest zrozumiały i wyczerpujący. Eksperymenty obejmują badania *in vivo* i *in vitro*. Doświadczenia *in vivo* posłużyły do oceny działania analgetycznego hybrydy. Doktorantka przeprowadziła te badania kompleksowo, używając nocyceptywnego bodźca termicznego, mechanicznego czy

zapalnego (model bólu tonicznego). Przeprowadziła zależność pomiędzy działaniem przeciwbólowym hybrydy a drogą jej podania (i.c.v., i.t, i.p., i.v.), oceniła działanie przeciwbólne hybrydy po jednorazowym i przewlekłym podaniu. Ponadto, przy użyciu selektywnych antagonistów Doktorantka oceniła udział receptorów opioidowych MOP oraz neurotensynowych NTS1 i NTS2 w działaniu antynocyceptywnym hybrydy oraz oszacowała objawy niepożądane występujące po podaniu tego związku. Doktorantka wykonała również szereg badań *in vitro*, takich jak: ocena charakteru ago-/antagonistycznego hybrydy względem receptora opioidowego MOP i neurotensynowego NTS1 i NTS2, ocena stabilności enzymatycznej dimeru (analiza chromatograficzna), przenikalność hybrydy przez barierę krew-mózg oraz analiza markerów tolerancji/zależności opioidowej (morfinowej) w różnych strukturach mózgu na podstawie zmian ilościowych białek cAMP, c-Fos i CREB oraz poziomu ekspresji receptorów MOP (z wykorzystaniem techniki Elisa) po podaniu tego związku. Jako substancję odniesienia, wobec której porównywano aktywność biologiczną hybrydy PK23 użyto agonisty receptorów MOP – morfiny. Opis poszczególnych procedur wzbogacony jest schematami przeprowadzonych doświadczeń i tabelami, co znacznie ułatwia zrozumienie zaprojektowanych badań. Do opracowania wyników Doktorantka zastosowała adekwatne metody statystyczne. Na wyróżnienie tej części rozprawy zasługuje użyty bogaty warsztat metodyczny służący to kompleksowego przebadania zsyntetyzowanego związku, wymagający wiedzy i odpowiedniego przygotowania technicznego.

Tak więc, wykorzystując różnorodne techniki podań ośrodkowych i obwodowych hybrydy oraz różne procedury badawcze Doktorantka uzyskała dużą pulę wyników, które przedstawiła w 4 tabelach i na 16 rycinach (str. 70-108). Część doświadczalna zasługuje na wysoką ocenę, a uzyskane wyniki stanowią spójną całość i mają duże znaczenie teoretyczno-poznawcze w dziedzinie oceny aktywności farmakologicznej nowych związków hybrydowych o działaniu przeciwbólowym. Ta część pracy dowodzi również ogromnego wkładu pracy jaki Doktorantka włożyła w realizację celu rozprawy. Uzyskane wyniki zostały szeroko omówione w 10 podrozdziałach.

Następnie przeprowadzono dyskusję otrzymanych wyników (str. 70-88). Również ta część pracy jest znakomicie opracowana od strony merytorycznej z poprawną interpretacją i uzasadnieniem, podaniem mechanizmów odpowiedzialnych za określone wyniki oraz porównaniem z wynikami innych autorów. Dyskusja odnosi się kolejno do oceny związków hybrydowych jako nowych leków, aktywności analgetycznej hybrydy PK23 w modelu ostrego bólu nocyceptywnego, aktywności nocyceptywnej hybrydy w teście formalinowym oraz działań niepożądanych hybrydy. Na uwagę zasługuje szczególnie część dyskusji odnosząca się do zależności struktura a powinowactwo hybrydy do receptorów opioidowych oraz receptorów NT, która została znakomicie opracowana. Praca doktorska zakończona jest 6 wnioskami.

Do najważniejszych osiągnięć recenzowanej pracy doktorskiej mgr farm. Karoliny Frączek zaliczam wykazanie, że:

1. Hybryda PK23 (połączenie farmakoforu opioidowego i neurotensynowego) posiada działanie analgetyczne w ostrym bólu nocycyptywnym wywołanym przez bodziec termiczny i mechaniczny (silniejsze działanie analgetyczne). Efekt ten jest prawdopodobnie związany z jej działaniem na poziomie rdzenia kręgowego.
2. Aktywność analgetyczna hybrydy jest związana z oddziaływaniem zarówno na receptory opioidowe jak i neurotensynowe.
3. Hybryda przenika przez barierę krew-mózg po podaniu obwodowym (dożylnym)
4. Tolerancja na działanie antynocycyptywne hybrydy rozwija się później aniżeli po podaniu morfiny
5. Hybryda charakteryzuje się korzystniejszym profilem bezpieczeństwa w stosunku do morfiny po podaniu jednorazowym (zaburzenia lokomotoryczne, wentylacja minutowa, ciśnienie tętnicze, częstość akcji serca)
6. Hybryda posiada krótkotrwałe działanie przeciwbólowe/przeciwzapalne w modelu bólu tonicznego, które wynika prawdopodobnie z jej krótkiego okresu półtrwania (względem morfiny)

Z obowiązku recenzenta wspomnę o pewnych drobnych niedociągnięciach czy sugestjach, które nasunęły mi się podczas czytania tekstu.

- Nie wytłumaczono, dlaczego fragment neurotensyny (NT₈₋₁₃) został użyty do budowy chimery.
- W części Metodyka brak piśmiennictwa przy deklaracji, że dawki substancji były wybrane na podstawie opublikowanych prac (str. 60). Przy schematach doświadczeń behawioralnych czy ich opisie bardzo pomocne byłoby umieszczenie dawek stosowanych związków (wyjątek schemat 4), ich czasu podania i liczby zwierząt w grupie. Myślę, że te informacje (tutaj umieszczone) znacznie pomogłyby w analizie przeprowadzonych badań.
- Rycina 18 i 19 przedstawiają przewlekłe podawanie związków. Jaki był cel (ryc. 18) pomiaru wyjściowego progu bólowego przez 8 dni przed podaniem związków? Czy rycina 19 nie pokazuje podobnych wyników jak ryc. 18 (tolerancja)?
- Na rycinie 15 brakuje grup kontrolnych, tj. jednej grupy, która otrzymywała 0.9% NaCl oraz drugiej grupy, która otrzymała 5% DMSO i 1% Tween. W badaniach

nocyceptywnych, z użyciem związku SR48692 grupa kontrolna powinna otrzymać odpowiedni rozpuszczalnik (5% DMSO i 1% Tween). W Tabeli 2 zabrakło neurotensyny i jej producenta.

- Czy oceniano indeks bezpieczeństwa (LD_{50}) dla hybrydy PK23?

Powyższe uwagi nie zmniejszają wartości prezentowanych wyników oraz mojej pozytywnej oceny recenzowanej pracy. Rozprawa doktorska mgr farm. Karoliny Frączek prezentuje ambitny projekt badawczy i pełną realizację celów w nim postawionych, wysoki poziom badań z zakresu farmakologii behawioralnej i analizy chromatograficznej oraz zawiera oryginalne wyniki dotyczące potencjalnie nowych leków o działaniu przeciwbólowym. Praca została napisana starannie, poprawnym językiem oraz przygotowana starannie pod względem edytorskim (ryciny, tabele). Należy nadmienić, że część wyników pracy doktorskiej zostało przedstawione w publikacji o wysokim współczynniku wpływu ($IF=7.002$), której Doktorantka jest pierwszym autorem (Frączek i wsp. Novel opioid-neurotensin hybrid peptide with spinal long-lasting antinociceptive activity and a propensity to delay tolerance development. *Acta Pharmaceutica Sinica* b, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.014>).

Reasumując, walory poznawcze, szeroki zakres badań, poprawna metodologia, a także ambitnie realizowany cel pozwalają stwierdzić, że praca doktorska mgr farm. Karoliny Frączek zasługuje na wysoką ocenę i spełnia wszystkie kryteria i wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

