



**KATEDRA I ZAKŁAD PATOFIZJOLOGII
UNIwersytetu Medycznego w Lublinie**

ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin

tel.: +48-81-448 65 05

fax: +48-81-448 65 00

Lublin, 21 listopada 2019

Prof. dr hab. n. med. Kinga Borowicz-Reutt

Kierownik Samodzielnej Pracowni Neuropatofizjologii Doświadczalnej

Katedra Patofizjologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

OCENA

pracy doktorskiej pt.:

**„WPLYW WYBRANYCH LEKÓW PRZECIWPADACZKOWYCH NA AKTYWNOŚĆ DRGAWKOWĄ W
EKSPERYMENTALNYM MODELU DRGAWEK U DOROSŁEGO DANIO PRĘGOWANEGO”**

mgr Mateusza Pieroga

wykonanej w Zakładzie Fizjologii Zwierząt

Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej

pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Wlazia

Padaczka towarzyszy ludziom (o ile "towarzystwo" to dobre określenie) od zarania dziejów. I od najdawniejszych czasów stanowi poważny problem terapeutyczny, nierozwikłany do dzisiaj, pomimo olbrzymiego postępu, jaki dokonał się w zakresie nauk medycznych w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat. Oporne na leczenie napady drgawkowe wciąż pozostają wyzwaniem nie tylko dla neurologów czy epileptologów, ale także dla farmakologów i patofizjologów. Wyniki uzyskiwane w zwierzęcych modelach drgawek pogłębiają wiedzę na temat patogenezy padaczki, pozwalają na identyfikację wielu substancji o działaniu przeciwdrgawkowym oraz na określenie ich profilu bezpieczeństwa w warunkach badań przedklinicznych, bez których nie można byłoby przecież rozpocząć fazy badań klinicznych.

Praca doktorska mgr Mateusza Pieroga wpisuje się w powyższą problematykę. Doktorant posłużył się modelem drgawek pentetrazolowych u ryby *Danio rerio*, który ma coraz większe szanse na stanie się pierwszym drgawkowym badaniem przesiewowym dla potencjalnych leków przeciwpadaczkowych, wyprzedzając testy drgawkowe przeprowadzane na gryzoniach.

Przystępując do szczegółowej oceny dysertacji doktorskiej, z przyczyn formalnych należy wspomnieć, że liczy ona 148 stron, napisana jest w klasycznym układzie, zawiera wszystkie wymagane elementy z zachowaniem odpowiednich proporcji. We wstępie Doktorant wyczerpująco opisuje istotę padaczki, charakterystykę leków przeciwpadaczkowych i miejsca ryby *Danio rerio* w badaniach behawioralnych, w tym epileptologii doświadczalnej. Dużym atutem jest jasne i logiczne opracowanie wpływu neuroprzekąźnictwa GABA-ergicznego i glutaminianergicznego na procesy drgawkowe, bez upraszczania, że aktywacja pierwszego hamuje, a drugiego generuje drgawki.

Cel pracy został jasno określony. Doktorant starannie zaplanował i przedstawił metodykę badań oraz sposób przeprowadzenia analizy statystycznej otrzymanych wyników. Za duży plus postrzegam przebadanie łącznie 9 leków przeciwpadaczkowych należących zarówno do pierwszej, jak i drugiej generacji. W obecnej pracy wykorzystano dorosłe osobniki *Danio rerio*. Pokusa wykorzystywania larw jest spora, tym bardziej, że to stadium rozwoju nie jest chronione przepisami prawa. Z drugiej strony nie można zapominać, że to formy bardzo niedojrzałe, w związku z tym ekstrapolacja wyników na warunki kliniczne wydaje się być mało prawdopodobna, a nawet niemożliwa. Na uwagę zasługuje także fakt, iż doktorant zdecydował się na podawanie leków przeciwpadaczkowych dootrzewnowo, a nie drogą immersji, co wydaje się trudniejsze, ale słuszniejsze. Krokiem w dobrym kierunku było uproszczenie skali drgawkowej Racine'a oraz własna modyfikacja pomiaru zachowań lękowych rybek w teście preferencji kolorów. Pozytywnie oceniam decyzję pomiaru stężeń leków przeciwpadaczkowych w całym organizmie *Danio* zamiast łączenia mózgów kilku osobników do jednego oznaczenia.

Dyskusja została napisana w dojrzały sposób. A nie było to łatwe, ponieważ przedmiotem były badania pozostające wciąż pilotażowymi, w związku z czym wyniki trudno jest porównać z innymi dostępnymi w literaturze. Z drugiej strony nowatorskie badania są dla badacza niewątpliwym wyzwaniem dostarczającym dużej satysfakcji odkrywania *terram incognitam*. Na uwagę zasługuje fakt, że Autor opisał najczęściej występujące trudności związane z zastosowaniem *Danio* w badaniach behawioralnych, a także wypunktował słabe ogniwa tego testu, np. niejednorodność metodyki, którą jeszcze bardziej komplikuje fakt wykorzystywania zarówno postaci dorosłych, jak i form larwalnych. Jednocześnie świadomość Doktoranta, że pewne artefakty można jeszcze wyeliminować – np. wpływ hormonów i fazy cyklu samic na procesy drgawkowe, przemawia za Jego dojrzałością naukową.

Wreszcie Autor wykazał się zrozumieniem i umiejętnością właściwego cytowania wykorzystanych w pracy pozycji piśmiennictwa. Bibliografia jest aktualna i prawidłowo dobrana.

Pracę wieńczy 6 wniosków, z których 5 pierwszych stanowi jednak podsumowanie uzyskanych wyników, oraz streszczenie napisane w języku polskim i angielskim.

Wynikiem lektury niniejszej pracy były także zamieszczone poniżej refleksje:

Niestety Doktorantowi trafiła się w roli recenzenta purystka językowa, która prosi o usunięcie przecinków przed imiesłowami przymiotnikowymi w całej pracy, stawia się je przed imiesłowami przysłówkowymi. Proszę też o unikanie sformułowania „leki przeciwpadaczkowe I, II rzutu”, powinno być raczej „I, II wyboru”.

We wstępie:

1. Przy opisywaniu nagłej niespodziewanej śmierci w padaczce (SUDEP) warto napisać więcej na temat patogenezы tego zaburzenia. Najczęstsze bezpośrednie przyczyny śmierci to niewydolność krążeniowa i/lub niewydolność oddechowa. Jak doktorant słusznie zauważył, śmierć często jest poprzedzona poważnymi zaburzeniami rytmu serca. Co ciekawe, zarówno zaburzenia rytmu, jak i drgawki mają wiele wspólnych elementów patogenezы, o czym warto byłoby wspomnieć w pracy.
2. Najważniejsze mechanizmy działania leków przeciwpadaczkowych można by pokazać w formie rysunkowej lub tabelarycznej. Taka forma jest korzystniejsza w odbiorze i dobrze podsumowuje dość długi opis.
3. Podobnie opis modelu drgawek pentetrazolowych u *Danio pręgowanego* powinien, moim oczywiście zdaniem, być uzupełniony tabelarycznym podsumowaniem zalet i wad tego modelu, a także różnic między tym modelem a drgawkami pentetrazolowymi u gryzoni. Bazy danych wyraźnie wskazują na to, że testy drgawkowe u *Danio* są wciąż znacząco rzadziej stosowane niż drgawki pentetrazolowe u myszy czy szczurów. U gryzoni karbamazepina i fenytoina są uznawane za leki nieaktywne w teście drgawek pentetrazolowych. U *Danio* są skuteczne, choć we względnie dużych dawkach. Takie komparatywne opracowanie byłoby bardzo ciekawe dla badaczy dokonujących wyboru testów drgawkowych do swoich celów.
4. Doktorant pisze w swojej pracy doktorskiej, że eksperymenty na rykach, stojących niżej w strukturze drzewa filogenetycznego w porównaniu z gryzoniami, jest bardziej akceptowalne. Doskonale rozumiem punkt widzenia Autora. Jednak z etycznego punktu widzenia porównywalnie szkoda zarówno rybek, jak i myszy, choć przecież obydwa gatunki są hodowane w celach doświadczalnych.
5. Tabele z przykładami behawioralnych modeli eksperymentalnych z wykorzystaniem *Danio pręgowanego* powinny być edytowane w orientacji poziomej kartki, w orientacji pionowej są bowiem mało czytelne.
6. Obserwowanie zachowania *Danio* w przedstawionych w tabelach modelach behawioralnych może wydawać się problematyczne. Sformułowania: „zmniejszona eksploracja zbiornika” czy

„wzrost impulsywności *Danio*” w badaniach zaburzeń lękowych brzmią bardzo ogólnie i mogą być różnie pojmowane przez różnych obserwatorów. Może to dawać duży margines błędu ludzkiego. Czy Doktorant mógłby na podstawie dostępnej literatury ocenić wiarygodność tych modeli?

Materiał i metody:

1. Doktorant pisze, że wymiany wody w akwariach dokonywano w objętości 10-25% w zależności od obsady i częstości karmienia ryb. A ryby były karmione 2-3 x dziennie. Są to więc elementy niestale. Czy i w jaki sposób mogło to wpłynąć na wiarygodność wyników?
2. Grupy doświadczalne składały się w zależności od testu z 8-12 osobników. Należy sprecyzować ile osobników w jakim teście. Z podpisów pod wykresami wynika natomiast, że grupa doświadczalna mogła liczyć 4-17 osobników. Skąd taka duża rozbieżność? W testach drgawkowych u gryzoni, w tym w klasycznym modelu pentetrazolowym, liczba zwierząt w grupie doświadczalnej jest stała i wynosi zazwyczaj 8 osobników. Doktorant nie wyjaśnił w metodyce, z jakich przyczyn liczebność grup u *Danio* jest tak niestala. Warto to wiedzieć, tym bardziej, że praca doktorska nosi znamiona badań pilotażowych i warto się często odnosić do różnic między testami drgawkowymi u *Danio* i gryzoni.
3. Leki przeciwpadaczkowe pozyskiwano z tabletek. Czy i w jaki sposób substancje pomocnicze mogły wpłynąć na wyniki? Tym bardziej, że masa ciała rybek jest około 100 x mniejsza od myszy.
4. Dlaczego Autor zdecydował się na pomiar czasu latencji drgawek, zamiast obliczenia dawek ED₅₀ leków dla drgawek toniczno-klonicznych, która to metoda przez wielu badaczy uważana jest za bardziej wiarygodną w ocenie aktywności przeciwdrgawkowej leków?

Wyniki:

1. W wykresach zawarto tak dużo danych, że warto byłoby zastosować kolory w celu zwiększenia ich czytelności.
2. W badaniach przeprowadzanych w celu określenia optymalnych czasów podawania leków, działanie np. fenobarbitalu było istotne tylko po 60 min i tylko w drgawkach SII. Czy Doktorant rozważał podanie leku w większej dawce w celu uzyskania bardziej wyrazistego efektu?
3. W pracy doktorskiej oceniany był wpływ leków przeciwpadaczkowych na okres latencji trzech faz drgawek pentetrazolowych u *Danio pręgowanego*. Czy należy rozumieć, że jeśli lek wpływa na wszystkie trzy fazy, to jego działanie przeciwdrgawkowe jest oceniane jako silniejsze niż jeśli wpływa tylko na jedną fazę? Jak to należy interpretować? W teście na aktywność ruchową obserwowano przepłynięty dystans i szybkość pływania rybek. W zaburzeniach lękowych badano czas przebywania *Danio* w odpowiednich strefach, liczbę przejść między strefami, czas bezruchu w strefach oraz w każdym przypadku wpływ barwy oraz interakcji dawka leku-barwa światła. Różne leki działały różnie na te parametry. Czy można cokolwiek wnioskować, jeśli np. topiramet jako jedyny lek wpływał istotnie na liczbę przejść do strefy czerwonej/żółtej. Czy to oznacza inną jakość

działania przeciwlękowego? Czy według Autora należy założyć, że wpływ leku na konkretny parametr świadczy o jakimś szczególnym aspekcie działania na aktywność ruchową lub zaburzenia lękowe? W pracy nie ma informacji na ten temat, a warto byłoby ten problem przedyskutować.

4. Wszystkie otrzymane dane z testów drgawkowych i objawów niepożądanych sugeruję umieścić w tabeli zbiorczej. Ułatwiłoby to szybkie porównanie działania poszczególnych leków i skorelowania dawek z występowaniem objawów niepożądanych.

5. Marzy mi się również porównanie dawek leków przeciwpadaczkowych, ich działaniem przeciwdrgawkowym i wywoływanymi objawami niepożądanymi u dorosłych *Danio*, jego larw oraz u gryzoni.

Dyskusja:

1. Opis układu krwionośnego powinien być uzupełniony adekwatnym rysunkiem.

2. Na str. 91 Doktorant dyskutuje wyniki uzyskane przez innych autorów i stwierdza, że nie wiadomo, czy względnie krótka immersja ryb (15 min) była wystarczająca do przeniknięcia odpowiedniej ilości do organizmu ryb. To słuszna wątpliwość, jednak mimo to autorom udało się zaobserwować 50% ochronę przed drgawkami, co jest warunkiem wystarczającym dla prawidłowego wnioskowania.

3. Doktorant pisze także w Dyskusji, że przy szybkim wydalaniu leku, może on przedostawać się do wody. Czy w tym przypadku nie będziemy mieć do czynienia z immersją, przynajmniej częściową? Czy można to uznać za czynnik wpływający na wynik końcowy?

Wnioski:

1. Pierwszych 5 punktów to podsumowanie, właściwym wnioskiem jest ten 5 i jest on prawidłowo sformułowany. W punktach stanowiących podsumowanie należałoby uszczegółowić informację, czyli np. wymienić, jakie leki wywoływały efekt przeciwdrgawkowy we wszystkich trzech stadiach napadowych. Punkt 3 może być przedmiotem dyskusji, ale nie powinien znaleźć się we wnioskach, ponieważ w pracy nie porównywano doświadczalnie drgawek u *Danio* i u gryzoni.

Wykaz skrótów:

1. Z wykazu należy wyeliminować jednostki SI i skróty powszechnie używane – czyli g, m, l, lux, s i ich pochodne.

Należy wyraźnie podkreślić, że wymienione uwagi w żaden sposób nie wpływają na wartość merytoryczną i ogólną pracy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko. Uważam, że jest ona samodzielnym i dojrzałym dorobkiem Doktoranta, odzwierciedla Jego wszechstronną wiedzę i

umiejętność jej przekazywania, dlatego spełnia wszystkie ustawowe wymogi będące podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora nauk biologicznych.

Mam zaszczyt i przyjemność przedstawić Szanownemu Panu Dziekanowi i Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

wniosek

o dopuszczenie **mgr Mateusza Pieroga** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Prof. dr hab. n. med. Kinga Borowicz-Reutt

KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni Neuropatofizjologii Doświadczalnej
Katedry i Zakładu Patofizjologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Prof. dr hab. n. med. Kinga Borowicz-Reutt

Kinga Borowicz-Reutt