

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Mateusza Pieróg pt. "Wpływ wybranych leków przeciwpadaczkowych na aktywność drgawkową w eksperymentalnym modelu drgawek u dorosłego danio pręgowanego".

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Wlazia. Tematyka pracy została dotyczy ważnego problemu medycznego i społecznego jakim jest ograniczona skuteczność i bezpieczeństwo dotychczasowych strategii leczenia padaczki. Pomimo, że testy farmakologiczne z wykorzystaniem gryzoni są najczęściej stosowane przy poszukiwaniu nowych leków przeciwpadaczkowych i badaniu patomechanizmów padaczki, istnieje duże zapotrzebowanie na metody alternatywne i z wykorzystaniem, też ze względów bioetycznych, niższych organizmów. Praca doktorska mgr Mateusza Pieróg weryfikuje przydatność behawioralnego modelu drgawek indukowanych chemicznie u danio pręgowanego w ocenie skuteczności i działań niepożądanych leków przeciwpadaczkowych. Niewątpliwymi zaletami danio pręgowanego jako modelu laboratoryjnego są jego niewielkie rozmiary, niskie koszty hodowli, łatwość rozmnażania i krótki cykl rozwojowy. Ponadto istotną korzystną cechą gatunku jest większa przeżywalność zmutowanych zarodków, użyteczność przezroczystych stadiów larwalnych do analiz mikroskopowych oraz posiadanie przez danio homologicznych odpowiedników ponad 70% genów ludzkich. Zatem zarówno wybór tematu pracy doktorskiej jak i modelu doświadczalnego można uznać za w pełni uzasadniony.

Praca doktorska posiada powszechnie przyjętą konstrukcję i układ rozdziałów. Liczy ogółem 148 stron wydruku komputerowego, zawiera 4 tabele i 23 dobrze opisane ryciny. Opracowanie redakcyjne pracy jest staranne i zachowane są odpowiednie proporcje w objętości kolejnych rozdziałów i podrozdziałów. Niefortunny natomiast jest format i ułożenie rozrysowanej na str. 34 - 38 tabeli 2, niekorzystnie wpływające na jej czytelność. Pracę dopełniają 283 pozycje nienumerowanego piśmiennictwa, ułożonego w porządku alfabetycznym. Piśmiennictwo zostało adekwatnie wybrane z uwzględnieniem najnowszych publikacji i jest poprawnie cytowane w tekście rozprawy.

Wstęp zajmuje 34 strony i został podzielony na 3 podrozdziały. W pierwszej części doktorant zgodnie ze współczesnym stanem wiedzy zapoznaje czytelnika z definicjami, etiologią i patogenezą padaczki. Zwraca uwagę nowa, obowiązująca klasyfikacja napadów padaczkowych. Szerzej rozbudowany jest fragment Wstępu przeznaczony na omówienie

neurochemicznego podłoża napadów padaczkowych, ze zwróceniem szczególnej uwagi na rolę układu glutaminianergicznego i GABA-ergicznego w tych zjawiskach. Wstęp świadczy o gruntownej znajomości przez doktoranta złożonych mechanizmów neurotransmisji i umiejętności opisywania ich w przystępny sposób. Z drobnych uwag krytycznych wymienię zbędne powtarzanie niektórych informacji na temat etiologii napadów padaczkowych na str. 5 i 11, nadmiernie rozbudowany akapit dotyczący niebędącej tematem pracy ekscytotoksyczności oraz brak wzmianki o molekularnych podstawach epileptogenezy. Drugi podrozdział Wstępu poświęcono omówieniu leków przeciwpadaczkowych z uwzględnieniem historii ich odkrywania, klasyfikacji, wskazań klinicznych i właściwości farmakodynamicznych. Tekst uzupełnia tabela 1 z zestawieniem mechanizmów działania leków przeciwpadaczkowych na podstawie publikacji Kwan i wsp. z roku 2001. Nie podważając zawartych w tabeli danych, sądzę, że celowe byłoby opracowanie tabeli w oparciu o nowsze, bardziej aktualne publikacje. Bardzo interesująco napisana jest trzecia część Wstępu, w której doktorant przedstawia argumenty świadczące o użyteczności danio pręgowanego jako organizmu modelowego w badaniach behawioralnych różnych schorzeń ośrodkowego układu nerwowego w tym padaczki. Kładzie nacisk na wartość neurobiologii behawioralnej jako nauki badającej związek między określonymi zmianami zachowania a funkcjonowaniem układu nerwowego. Dokładnie omówiono i przedstawiono na rycinie 1 topologię struktur kresomózgowia u gryzoni i ryb, zaznaczając w tekście, iż podstawowy układ neuroanatomiczny u danio jest typowy dla kręgowców. Przytacza też szereg faktów z ostatnich 10 lat świadczących o rozwoju i coraz szerszym wdrażaniu testów behawioralnych z użyciem danio pręgowanego w laboratoriach farmakologicznych na świecie. Ponadto dane dotyczące licznych modeli laboratoryjnych z wykorzystaniem danio zostały ujęte w formie tabelarycznej.

Cele pracy poprzedzone porównawczą charakterystyką modelu drgawkowego indukowanego zanurzeniem larwalnego i dorosłego danio w roztworze pentetrazolu (PTZ) zostały precyzyjnie sformułowane w trzech punktach. Zaplanowano zbadanie wpływu dootrzewnowo podawanych 5 klasycznych leków przeciwpadaczkowych (kwas walproinowy, fenytoina, karbamazepina, diazepam, fenobarbital) oraz 4 leków drugiej generacji (lamotrygina, topiramata, felbamat, lewetiracetam) na drgawki indukowane PTZ u dorosłych danio. Zdecydowano zbadać także ewentualne działanie niepożądane leków przeciwpadaczkowych przez pomiar zmian aktywności ruchowej i zachowania lękowe. W trzecim punkcie mierzono stężenia testowanych leków w homogenatach ciał danio w czasach odpowiadających wystąpieniu maksymalnego działania leków. Tak sformułowane

cele pracy, zwłaszcza punkt 1 i 2, można uznać za prawidłowe i stwarzające szanse uzyskania wartościowych wyników. Krytyczną uwagę mam do punktu 3. Mam wątpliwość czy miarodajny jest pomiar stężenia leku w homogenacie całego danio, a nie w jego systemie nerwowym (kresomózgowiu), zwłaszcza że lek podawany jest dootrzewnowo. Doktorant jest świadomy niedoskonałości pomiaru uśrednionego stężenia leku i odnosi się do tego zastrzeżenia w Dyskusji wyników. Z drugiej strony, należy podkreślić innowacyjność modelu ponieważ dotychczas testy PTZ były przeprowadzane tylko na stadium larwalnym danio.

\ Materiały i metody czytelnie opisano na 12 stronach rozprawy. Warunki hodowlane, aklimatyzacja i przydział zwierząt do grup doświadczalnych nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Zamieszczono w tym rozdziale akceptację i numer uchwały Lokalnej Komisji Etycznej oraz nazwy producentów leków i innych stosowanych w doświadczeniach substancji chemicznych. Bardzo szczegółowo opisano procedurę przygotowania leków i wstrzyknięć dootrzewnowych oraz schemat postępowania przy eksperymentach. Liczebność zwierząt w grupach doświadczalnych, czas i sposób podawania leków oraz zastosowane przez doktoranta testy statystyczne były właściwie wybrane i odpowiadały obowiązującym standardom badań farmakologicznych. Test pentetrazolowy jest uznaną na świecie metodą testowania potencjalnych leków przeciwpadaczkowych. Dla celów rozprawy test PTZ został odpowiednio zmodyfikowany (uproszczono skalę Racine'a oceny drgawek) i wyznaczono dla każdego leku przeciwpadaczkowego czas maksymalny jego działania. Akceptowalne są także testy wybrane przez doktoranta do oceny zaburzeń aktywności ruchowej oraz zaburzeń lękowych. Opis sugeruje, że przeprowadzenie testów z podaniem leków i. p. u danio wymagały umiejętności i wysokiej sprawności manualnej eksperymentatora. Zadowalająco opisano test aktywności ruchowej oraz test badający zachowania lękowe. W obu testach zastosowano odpowiednią aparaturę i mierzono właściwe parametry. Co ciekawe, dwukomorowy aparat pomiarowy do testu preferencji kolorów został zaprojektowany i zbudowany na potrzeby recenzowanej pracy doktorskiej. Nie zamieszczono jednak nazwiska projektanta i nie ujawniono czy aparat ten jest wzorowany na komercyjnie dostępnej aparaturze, czy też jest innowacyjnym urządzeniem prototypowym. Oznaczenia stężenia leków przeciwpadaczkowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) zostały przeprowadzone na Wydziale Farmaceutycznym CM UJ. Opis przygotowania próbek do pomiarów i sposób przeprowadzenia analizy chromatograficznej jest bardzo szczegółowy. Uznanie budzi wysoka selektywność metody i niskie współczynniki zmienności dla wszystkich badanych związków. W tym miejscu powraca jednak myśl czy nie należało oznaczać stężenia leków w głowach a nie łącznie w głowach i tułowiach danio po dekapitacji.

Na przeszkodzie stanęła tu nikła masa dostępnej tkanki (o czym autor wspomina w Dyskusji) i, być może, nie wystarczająca czułość metody.

Wyniki opisano i zilustrowano w formie 23 wykresów i jednej tabeli na 30 stronach rozprawy. Wykazano, że kwas walproinowy i fenytoina w sposób zależny od dawki zwiększały latencję stadium pierwszego (SI) i drugiego (SII) a w najwyższej dawce VPA hamował także stadium trzecie (SIII) indukowanego przez PTZ napadu drgawkowego. Pozostałe leki przeciwpadaczkowe wykazały zróżnicowane działanie hamujące na aktywność drgawkową, przy czym topiramet i felbamat opóźniły wystąpienie tylko stadium I drgawek. Aktywność ruchową danio znamienne hamowały diazepam i topiramet. Wykazano działanie przeciwlękowe wobec awersyjnej barwy żółtej dla fenobarbitalu, felbamatu, topiramatu i fenytoiny, natomiast kwas walproinowy, diazepam i lewetiracetam działały słabo anksjolitycznie. Pomiarzy HPLC dowiodły że stężenia leków przeciwpadaczkowych utrzymują się w czasie ich maksymalnego działania u dorosłego danio, lecz nie pozwoliły na ocenę dystrybucji leków w organizmie.

Dyskusja wyników jest wysoce kompetentna, akcentująca zarówno mocne jak i słabe strony pracy doktorskiej. Na pierwszych stronach tego rozdziału doktorant odnosi się głównie do aspektów metodycznych. Omawia różnice w wykorzystywanym powszechnie w badaniach biologicznych stadium larwalnym danio z nierozwiniętym układem nerwowym a osobnikiem dorosłym. Powołując się na właściwe pozycje piśmiennictwa uzasadnia szerzej niż we Wstępie celowość zastosowanych testów behawioralnych i specjalistycznej aparatury. Zwraca przy tym uwagę na ograniczenia metodyczne niniejszej rozprawy, takie jak konieczność podawania leków dootrzewnowo zamiast wygodniejszej imersji ryby w roztworze leku, pominięcie ewentualnego wpływu hormonów płciowych na mierzone parametry oraz brak możliwości rejestracji zachowań danio podczas pionowej eksploracji zbiornika będącej miernikiem stresu. Dyskusyjna jest teza autora rozprawy sugerująca przydatność stosowanego modelu w wysokoprzepustowych poszukiwaniach bibliotek związków chemicznych, jeśli testowane związki miałyby być podawane dootrzewnowo. Komentując wyniki pomiaru stężeń leków przeciwpadaczkowych w homogenatach ryb doktorant podkreśla jeszcze jedno ograniczenie stosowanego modelu drgawek pentetrazolowych u danio, jakim jest brak pomiarów parametrów farmakokinetycznych testowanych leków przeciwpadaczkowych. To ograniczenie nakazuje ostrożność przy wynikach badań behawioralnych. W mojej opinii doktorant znakomicie wywiązał się z tego zadania i w pozostałej części rozdziału, w którym omawia kolejno skuteczność w hamowaniu drgawek i efekty niepożądane leków przeciwpadaczkowych unika szerszych spekulacji i zbyt

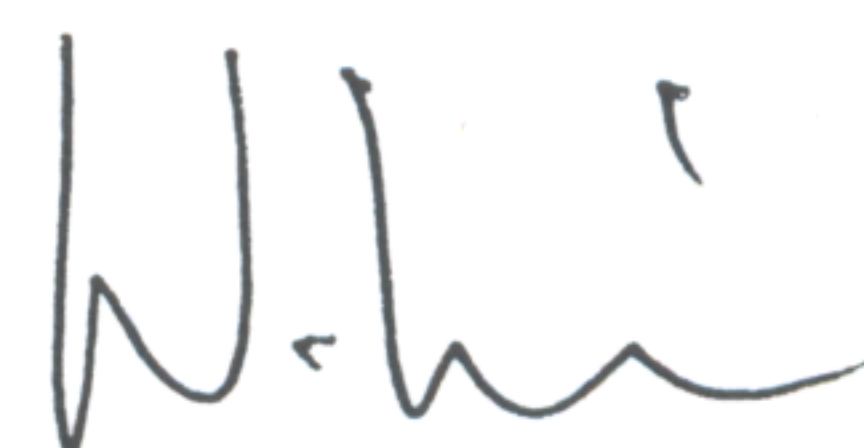
daleko idących sugestii. Wnikliwa analiza efektów farmakologicznych leków przeciwpadaczkowych u danio jest porównywana z działaniami tych leków w teście PTZ u myszy i szczurów ze zwróceniem szczególnej uwagi na różnice w biodostępności leków. Doktorant konkluduje, że zaprezentowany model jest obiecujący przy poszukiwaniu nowych leków a przeprowadzone w ramach rozprawy doświadczenia stanowią próbę wyznaczenia standardowych procedur ułatwiających prowadzenie badań podstawowych nad padaczką.

Wnioski odpowiadające ściśle uzyskanym wynikom zostały precyzyjnie ujęte w sześciu punktach. Końcowe rozdziały pracy doktorskiej to zwięzłe, ale zawierające istotne informacje, streszczenie w języku polskim i angielskim. W pracy zamieszczono prawidłowo, choć niezbyt konsekwentnie w odniesieniu do nazw w języku angielskim, opracowany wykaz skrótów. Tu drobna uwaga – brak często stosowanego w tekście skrótu PTZ i jego rozwinięcia. Obszerne Piśmiennictwo zawiera reprezentatywne prace opublikowane w większości w ostatnich dziesięciu latach.

Rozprawę doktorską mgr Mateusza Pieróg pt. “Wpływ wybranych leków przeciwpadaczkowych na aktywność drgawkową w eksperymentalnym modelu drgawek u dorosłego danio pręgowanego” oceniam wysoce pozytywnie. Praca została starannie zaplanowana, a otrzymane w pracochłonnych eksperymentach wyniki są nowatorskie, oryginalne i wartościowe. Oświadczam także, iż poczynione z obowiązku recenzenta uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy. Rozprawa spełnia wszystkie kryteria ustawowe stawiane dysertacjom naukowym zgodnie z art.13 ust.1 ustawy z dn. 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.).

Wnioskuje o dopuszczenie mgr Mateusza Pieróg do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 30.10.2019


prof. dr hab. Władysław Lasoń