

## OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Basińskiej-Ziobron pt. "Interakcja lewomepromazyny, neuroleptyku o szerokim spektrum działania klinicznego, z ludzkim wątrobowym cytochromem P450" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Władysławy Anny Daniel w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

Lewomepromazyna pomimo, że jest lekiem należącym do tzw. klasycznych neuroleptyków, nadal znajduje zastosowanie kliniczne, przede wszystkim w leczeniu schizofrenii (z objawami pobudzenia i obniżonego nastroju), jak również w postępowaniu przeciwbólowym i przeciwwymiotnym. Pomimo wieloletniego zastosowania klinicznego, a może i z tej przyczyny, zważywszy czas jej dopuszczenia do obrotu, metabolizm i wpływ na ludzki cytochrom P450 lewomepromazyny nie został w dostatecznym stopniu poznany, co może wpływać na możliwość przewidywania ryzyka jej interakcji z innymi lekami oraz konieczności modyfikacji dawkowania w stanach patologicznych związanych ze zmianą aktywności wątrobowego cytochromu P450. W światowej literaturze dostępnych jest jedynie kilka publikacji naukowych poświęconych szeroko pojętej tematyce interakcji lewomepromazyny z ludzkim cytochromem P450 (w większości opublikowanych przez zespół kierowany przez prof. Władysławę Annę Daniel), które wskazują na wątrobowy metabolizm badanego leku oraz możliwość indukcji/inhibicji cytochromu P450. Aktualnie prowadzone przez Doktorantkę badania wpisują się więc w długoletni plan badawczy zespołu, w którym obecnie pracuje.

Doktorantka podjęła się badań, w złożonym układzie eksperymentalnym, mających na celu ustalenie udziału poszczególnych izoenzymów cytochromu P450 w metabolizmie lewomepromazyny u człowieka. Szczegółowe cele pracy doktorskiej obejmowały: 1. Określenie udziału izoenzymów cytochromu P450 w katalizowaniu głównych reakcji metabolicznych lewomepromazyny – 5-sulfoksydacji i N-demetylacji (lewomepromazyna jako substrat CYP); 2. Zbadanie bezpośredniego wpływu lewomepromazyny na aktywność głównych izoenzymów ludzkiego cytochromu P450 (lewomepromazyna jako inhibitor CYP); 3. Ocenę zdolności lewomepromazyny do indukowania głównych izoenzymów ludzkiego cytochromu P450 (lewomepromazyna jako induktor CYP). Określenie interakcji lewomepromazyny z ludzkim wątrobowym cytochromem P450 umożliwi optymalizację klinicznego zastosowania leku poprzez wskazanie możliwych interakcji międzylekowych oraz uwzględnienie zmiany aktywności cytochromu P450 w wątrobie w stanach patologicznych (np. w przebiegu zapalnych chorób ogólnoustrojowych czy też wątroby).

Tematyka pracy doktorskiej jest w pełni uzasadniona, jej wyniki przyczyniają się do uzupełnienia

niedostępnej aktualnie wiedzy dotyczącej interakcji lewomepromazyny z ludzkim wątrobowym cytochromem P450. O aktualności tematyki badawczej świadczy również fakt finansowania badań z funduszy projektu KNOW (Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący) oraz grantów OPUS (2011/01/B/NZ4/04859) i PRELUDIUM (2014/15/N/NZ7/02955) przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki.

We wstępie, stanowiącym doskonałe wprowadzenie do pracy doktorskiej, Doktorantka przedstawiła współczesne poglądy dotyczące izoenzymów cytochromu P450 w wątrobie zaangażowanych w metabolizm leków i innych ksenobiotyków. Druga część wstępu jest poświęcona charakterystyce leków neuroleptycznych, wraz z ich wzajemnym oddziaływaniem z poszczególnymi izoenzymami cytochromu P450. Poszczególne podrozdziały Wstępu stanowią znakomite opracowania i z całą pewnością po dalszym dopracowaniu mogłyby zostać opublikowane jako prace poglądowe.

Dla zrealizowania postawionych celów Autorka przeprowadziła szereg wzajemnie uzupełniających się badań *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich mikrosomów wątrobowych, rekombinowanych ludzkich izoenzymów CYP oraz hodowli ludzkich hepatocytów. Należy stwierdzić, że badania zaplanowano z dużą starannością w oparciu o niewątpliwie ogromną wiedzę i doświadczenie promotora. Metodyka badań i sposób ich realizacji (znajdujący odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach oraz ich interpretacji) świadczą o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktorantki oraz opanowaniu metodologii wielu technik/procedur laboratoryjnych. Metodyka badań obejmuje niezbędne do prawidłowego wnioskowania techniki *in vitro* w badaniach interakcji leków z ludzkim cytochromem P450. W przyszłości uzupełnieniem uzyskanych wyników mogłyby być badania *in vivo*, np. interakcji leków w warunkach klinicznych lub też z wykorzystaniem humanizowanych myszy. W podsumowaniu tej części recenzji należy stwierdzić, że metodyka badania jest bardzo nowoczesna, plan badań dobrze skonstruowany, metody statystyczne prawidłowo dobrane.

Doktorantka wykazała m.in., że głównym izoenzymem cytochromu P450, zaangażowanym w procesy 5-sulfoksydacji i N-demetylacji lewomepromazyny jest izoenzym CYP3A4 (z niewielkim udziałem izoenzymu CYP1A2); lewomepromazyna bezpośrednio silnie hamuje aktywności izoenzymu CYP2D6 oraz w umiarkowanym stopniu aktywności CYP3A4 i CYP1A2; wysokie stężenia lewomepromazyny indukują ekspresję genu CYP3A4 i zwiększają aktywność izoenzymu CYP3A4. Sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza bardzo dobre przygotowanie metodyczne i szeroką wiedzę dotyczącą tematyki prowadzonych badań. Być może uzasadnione byłoby przedstawienie danych dotyczących mikrosomów wątrobowych od pacjentów HG93 i HH40 na rycinie 4 (wykresy Eadie-Hofstee) (nie tylko

pacjenta HG 88, z komentarzem, że w przypadku pozostałych pacjentów uzyskano wyniki podobne). Uzyskane wyniki w kompleksowy sposób uzupełniają dotychczasową wiedzę dotyczącą interakcji lewomepromazyny z cytochromem P450 i mają znaczenie nie tylko poznawcze ale i w pełni aplikacyjne.

Dyskusja przeprowadzona przez Autorkę jest prowadzona bardzo dojrzałe. Doktorantka umiejętnie odniosła własne wyniki do dostępnych danych literaturowych, nie tylko lewomepromazyny ale również innych pochodnych fenotiazyny. Doktorantka wskazała potencjalne kliniczne znaczenie uzyskanych wyników w oparciu o stężenia lewomepromazyny w osoczu i wątrobie.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła osiem wniosków: 1. Izoenzym cytochromu P450 3A4 – CYP3A4 jest głównym izoenzymem zaangażowanym w metabolizm lewomepromazyny w wątrobie człowieka w terapeutycznym stężeniu neuroleptyku (około 10  $\mu\text{M}$  w wątrobie). W wyższym, toksycznym stężeniu lewomepromazyny (około 100  $\mu\text{M}$  w wątrobie), udział CYP3A4 ulega zmniejszeniu, podczas gdy udział CYP1A2 w metabolizmie lewomepromazyny istotnie zwiększa się; 2. Główne procesy metaboliczne lewomepromazyny (5-sulfoksydacja i N-demetylacja) nie powinny ulegać wysyceniu w warunkach klinicznych, gdyż wartości  $K_m$  dla tych procesów są wyższe od stężenia terapeutycznego; 3. Udział izoenzymów CYP w katalizowaniu metabolizmu neuroleptyków pochodnych fenotiazyny zależy od struktury leku (zarówno budowy łańcucha bocznego, jak i obecności podstawników w pierścieniu aromatycznym), a przez to i różnego ułożenia przestrzennego cząsteczek neuroleptyków w centrum katalitycznym enzymu; 4. Leki będące substratami dla CYP3A4 (np. leki przeciwdepresyjne, lurasidon, karbamazepina, antagoniści kanałów wapniowych, antybiotyki makrolidowe, testosteron), mogą konkurować z lewomepromazyną o ten izoenzym. Ponadto metabolizm lewomepromazyny może być hamowany lub przyspieszany przez leki, które są odpowiednio inhibitorami (erytromycyna, SSRI) lub induktorami (rifampicyna, karbamazepina) izoenzymu CYP3A4; 5. Lewomepromazyna bezpośrednio, silnie hamuje aktywność CYP2D6 oraz w mniejszym stopniu aktywność CYP1A2 i CYP3A4. Obserwowane *in vitro* hamowanie izoenzymów CYP może także zachodzić *in vivo* (zwłaszcza hamowanie CYP2D6), ponieważ wyznaczone wartości  $K_i$  są niższe lub bliskie spodziewanemu stężeniu lewomepromazyny w wątrobie człowieka; 6. Lewomepromazyna może zatem hamować metabolizm innych, jednocześnie przyjmowanych leków, będących substratami izoenzymu CYP2D6 (np. TLPD, SSRI, mirtazapina, wenlafaksyna, kodeina, dekstrometorfan, propranolol), a być może również izoenzymów CYP1A2 (np. kofeina, TLPD, propranolol, asenapina) i CYP3A4 (np. benzodiazepiny, nefazodon, lurasidon, antagoniści kanałów wapniowych, antybiotyki makrolidowe, testosteron), co wymaga dalszych badań *in vivo*; 7. Lewomepromazyna w wyższym stężeniu (2,5  $\mu\text{M}$ ), które jest osiąganym w wątrobie przy terapeutycznym stężeniu leku w osoczu ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ), indukuje ekspresję genu CYP3A4 oraz zwiększa aktywność izoenzymu CYP3A4 w hepatocytach

wątroby ludzkiej. Biorąc pod uwagę stosowane dawki lewomepromazyny oraz stężenia osiągnięte w wątrobie, indukcja ekspresji izoenzymu CYP3A4 wydaje się możliwa u pacjentów *in vivo*; 8. Lewomepromazyna poprzez indukcję izoenzymu CYP3A4 może przyspieszać własny metabolizm, a także metabolizm innych leków będących substratami izoenzymu CYP3A4. Efekt ten może być widoczny po dłuższej ekspozycji na lewomepromazynę, przy niskim aktualnym stężeniu neuroleptyku, ze względu na możliwość bezpośredniego hamowania tego izoenzymu przez neuroleptyk. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski dobrze oddają uzyskane wyniki, wynikają bezpośrednio z analizy wyników uzyskanych w czasie realizacji badań, być może za wyjątkiem wniosków 3, 4, 6 (które opierają się na ogólnie dostępnej wiedzy i nie wynikają bezpośrednio z wyników badania). Niektóre spośród nich są jednakże raczej przytoczeniem wyników powinny mieć raczej bardziej uogólniony charakter.

Praca jest napisana w sposób przejrzysty, ma układ typowy dla tego typu rozpraw obejmuje wstęp, hipotezę badawczą/cel pracy, materiał i metody, wyniki badań oraz dyskusję wyników, wnioski i wykaz piśmiennictwa oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawa doktorska obejmuje 102 strony (oraz zamieszczone w odrębnym aneksie ryciny i tabele). Piśmiennictwo w liczbie 225 pozycji zamieszczono we właściwy sposób. Przejrzystości pracy dodaje umiejętne podzielenie poszczególnych części na podrozdziały, jak również umieszczenie rycin i tabel w odrębnym zeszycie, co bardzo ułatwia zapoznanie się z rozprawą i jej ocenę. Praca jest opracowana w bardzo staranny sposób, zawiera nieliczne błędy, nie wpływające na jej wysoką ocenę (np. błędne oznaczenie symbolu genu  $\beta$ -aktyny – powinno być *ACTB*).

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autorki, która dobrze opanowała niełatwy warsztat badawczy i wykazała dobre merytoryczne przygotowanie. Uważam, że praca stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim. Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Basińskiej-Ziobroń do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na dużą wartość poznawczą wyników oraz opublikowanie ich części w renomowanych czasopismach *Pharmacological Reports* (2015;67(6):1178-82 – Doktorantka jest pierwszym autorem) oraz *Biochemical Pharmacology* (2014;90(2):188-95 - Doktorantka jest drugim autorem) i *Pharmacological Reports* (2014;66(6):1122-6 - Doktorantka jest drugim autorem) wnioskuję o wyróżnienie pracy „*Summa cum laude*”.

Prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik