



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

## Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

### Wydział Farmaceutyczny

Dr hab. n. farm. Maria Walczak, prof. UJ  
Katedra i Zakład Toksykologii  
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków  
e-mail: [maria.walczak@uj.edu.pl](mailto:maria.walczak@uj.edu.pl); tel. +4812/6205630

### RECENZJA

#### rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Basińskiej-Ziobroń

Kraków, dn. 25 sierpnia 2020 r.

Ocenę przygotowano na podstawie pisma Dyrektora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

#### Informacje ogólne

Podstawą ubiegania się mgr inż. Agnieszki Basińskiej-Ziobroń o stopień naukowy doktora jest monografia zatytułowana „Interakcje lewomepromazyny, neuroleptyku o szerokim spektrum działania klinicznego, z ludzkim wątrobowym cytochromem P450”.

Rozprawa doktorska obejmuje 102 strony i składa się z wykazu skrótów użytych w pracy, wstępu będącego wprowadzeniem do aspektu biologicznego i analitycznego tematu, celu pracy, opisu zastosowanej metodologii, wyników badań, ich dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim, bibliografii składającej się z 225 pozycji ułożonych w sposób logiczny i uporządkowany, spisu rycin (22) i tabel (9) oraz informacji o finansowaniu projektu.

#### Ocena rozprawy doktorskiej

Przedmiotem badań pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Basińskiej-Ziobroń była kompleksowa ocena metabolizmu wątrobowego lewomepromazyny – neuroleptyku szeroko stosowanego w praktyce klinicznej, w aspekcie interakcji farmakokinetycznych, mogących skutkować zmienioną eliminacją tego leku, a w konsekwencji interakcji farmakodynamicznych, objawiających się osłabieniem lub nasileniem działania

terapeutycznego tego leku. Doktorantka podjęła się niełatwych badań nad oceną udziału izoenzymów cytochromu P450 w katalizowaniu głównych ścieżek metabolizmu lewomepromazyny u człowieka. Zagadnienia poruszane przez Autorkę są oryginalne i nie zostały opisywane do tej pory w literaturze naukowej przez innych badaczy, a wybór leku jest dobrze uzasadniony merytorycznie.

Oceniana praca doktorska wykonana w Zakładzie Farmakokinetiki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. Władysławy Anny Daniel, wybitnej specjalistki w dziedzinie farmakokinetyki i metabolizmu leków jest doskonałym przykładem kompleksowego podejścia do badań złożonych procesów farmakokinetycznych.

Streszczenie pracy stanowi wnikliwą syntezę tematu odzwierciedlającą poszczególne części rozprawy, podkreślając najważniejsze informacje opisane szczegółowo w kolejnych rozdziałach dysertacji.

W części teoretycznej pracy Doktorantka przedstawiła informacje szeroko naświetlające zakres tematyczny podjętych badań. W pierwszej części wstępu wprowadzono czytelnika w temat izoenzymów cytochromu P450, podkreślając ich zmienność międzygatunkową, jak również konserwatywność i podobieństwo sekwencyjne niektórych z nich, które pozwala na ustalenie u zwierząt sekwencji analogicznych do ludzkich i prowadzenie badań z udziałem organizmów modelowych. W rozdziale tym podkreślono, że aktywność enzymów CYP modulowana jest przez substancje endogenne i egzogenne, w wyniku indukcji bądź inhibicji. Niezwykle istotne jest zwrócenie przez Doktorantkę uwagi na wzajemne oddziaływania przyjmowanych przez pacjenta leków, wielokrotnie niekorzystnie wpływające na końcowy efekt ich stosowania i stanowiące jeden z ważnych problemów współczesnej farmakoterapii.

Grupą pacjentów szczególnie narażoną na występowanie niepożądanych działań leków są osoby starsze, co wiąże się przede wszystkim ze zjawiskiem wielochorobowości i wielolekowości. W rozdziale tym podkreślono znaczenie uwarunkowań genetycznych, szczególnie w procesie biotransformacji leków, powodujące zaburzenia ich eliminacji. Następstwem tego zjawiska jest zróżnicowanie stężeń substancji leczniczych po podaniu ich standardowych dawek i zwiększone ryzyko występowania objawów niepożądanych u osób z wolnym metabolizmem lub niewystarczającego działania leczniczego, w przypadku szybko i ultraszybko zachodzących procesów biotransformacji.

W tym aspekcie Doktorantka zwróciła uwagę na często spotykane w praktyce zjawisko politerapii w psychiatrii. Metabolizm większości leków psychotropowych

zachodzący przy udziale izoenzymów cytochromu P450 predysponuje do występowania interakcji farmakokinetycznych. Od rodzaju i szybkości przemian leków zależy nie tylko siła ich działania, ale również występowanie działań niepożądanych i toksycznych. W rozdziałach tych, w sposób przejrzysty i zwięzły Autorka dowiodła bardzo dobrej znajomości badanej problematyki.

Po lekturze wstępu nasuwa się pytanie o inne metabolity lewomepromazyny. W przytaczanej przez Doktorantkę pracy P.A. Hals oraz S.G. Dahl opublikowanej w *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* w 1995 r. wykazano obecność kilka metabolitów lewomepromazyny, w tym O-demetylo 3-hydroksy lewomepromazyny, O-demetylo 7-hydroksy lewomepromazyny, N,O-didemetylo 7-hydroksy lewomepromazyny oraz O-demetylo lewomepromazyny. W moim odczuciu zamieszczenie w Dysertacji schematu ze wszystkimi, również potencjalnymi szlakami metabolizmu tego leku byłoby pomocne w lepszym zrozumieniu ścieżek metabolizmu leku.

W celu pracy Autorka uzasadniła istotę i znaczenie podjętych badań oraz przedstawiła ogólne założenia pracy, skupiające się na określeniu udziału wybranych izoenzymów cytochromu P450 w metabolizmie lewomepromazyny, w tym na ocenie leku jako substratu, induktora lub inhibitora enzymatycznego, w aspekcie interakcji farmakokinetycznych. Zaprezentowany cel sygnalizuje szeroki zakres pracy włożonej w realizację ambitnych założeń, co zresztą znajduje potwierdzenie w dalszych częściach rozprawy.

W części doświadczalnej Doktorantka bardzo dokładnie i szczegółowo opisała zastosowane procedury badawcze, które pozwoliły na dokładne śledzenie zaplanowanych etapów badań i uzyskane wyniki. Wykonanie tych badań wymagało przeprowadzenia dużej ilości czasochłonnych i pracochłonnych doświadczeń. W rozdziale tym Autorka po zapoznaniu czytelnika z wykorzystanymi materiałami i odczynnikami opisuje ścieżkę syntezy 5-sulfotlenku lewomepromazyny oraz N-demetylolewomepromazyny wykonaną w Zakładzie Chemii Leków IF PAN oraz warunki, w jakich badała metabolizm lewomepromazyny, w kierunku oceny kinetyki reakcji 5-sulfoksydacji oraz N-demetylacji w ludzkich mikrosomach wątrobowych, w Supersomach zawierających rekombinowane ludzkie izoenzymy CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 oraz w kriokonserwowanych ludzkich hepatocytach.

W metodyce opisano również warunki badania wpływu amitryptyliny i karbamazepiny na metabolizm lewomepromazyny w mikrosomach wątrobowych, wyznaczając podstawowe parametry kinetyki enzymatycznej. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka precyzyjnie opisała wszystkie kroki związane z hodowlą ludzkich hepatocytów,

w których badano potencjał lewomepromazyny do indukowania izoenzymów CYP. Rozdział ten zamyka opis metodyki oznaczania poziomu mRNA izoenzymów CYP w hepatocytach metodą qRT-PCR. Stężenia lewomepromazyny oraz jej metabolitów (5-sulfotlenku lewomepromazyny i N-demetylolewomepromazyny), jak również stężenia substratów izoenzymów CYP oraz powstających metabolitów oznaczano z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detekcją UV, wzorując się na opublikowanych przez innych autorów metodach oznaczania tych związków.

Wiadomym jest, że wiarygodność oznaczeń w materiale biologicznym zależy zarówno od doboru i optymalizacji warunków przygotowania próbek do analizy, jak i od właściwie opracowanej i zwalidowanej metody bioanalitycznej. Wyzwanie to jest tym większe, im mniejsze jest stężenie oznaczanych składników w próbce. Należy pamiętać, iż w procesie przygotowania próbek do analizy trudność stwarzają składniki matrycy badanych próbek, które występują zwykle w znacznym nadmiarze w stosunku do analitów, będąc potencjalnym źródłem efektów interferencyjnych, i w konsekwencji błędów analitycznych. W moim odczuciu zdefiniowanie parametrów walidacji, a także szczegółowe i krytyczne podejście do aspektu zastosowanej metody analitycznej wymagało podkreślenia, pokazując zrozumienie ważności tego etapu prac i jego wpływu na wyniki badań właściwych próbek, a tym samym interpretację biologiczną uzyskanych wyników. Pytanie, które nasuwa mi się po lekturze tej części pracy wiąże się z walidacją metod bioanalitycznych, a mianowicie jakie parametry walidacji metody bioanalitycznej zostały ocenione?

Lewomepromazynę badano w kierunku hamowania oraz indukowania aktywności izoenzymów CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 oraz CYP3A4 odpowiednio w ludzkich Supersamach lub ludzkich hepatocytach stosując specyficzne substraty dla poszczególnych izoenzymów CYP, takie jak kofeina, diklofenak, perazyna, bufuralol, testosteron i oznaczając stężenia substratów i powstających metabolitów. W tym miejscu nasuwa się pytanie czy inhibitory te do każdej próbki dodawano pojedynczo, czy w postaci koktajlu?

W kolejnym punkcie Doktorantka wymienia testy statystyczne, którymi posłużyła się do opracowania wyników przeprowadzonych analiz. W tym miejscu nasuwa się pytanie, jaki parametr decydował o doborze odpowiednich metod parametrycznych lub nieparametrycznych do oceny znamienności statystycznej? Jaką wartość  $p$  przyjęto za granicę znamienności statystycznej?

Kolejną część pracy stanowi przedstawienie wyników z przeprowadzonych badań. Struktura i forma przedstawianych wyników jest czytelna i umożliwia łatwe poruszanie się

czytelnika po opisywanych zagadnieniach. Pierwsze dane dotyczą oceny 5-sulfoksydacji i N-demetylacji lewomepromazyny w ludzkich mikrosomach wątrobowych, wyznaczenia parametrów kinetycznych dla tych procesów oraz poszukiwania korelacji pomiędzy aktywnością izoenzymów CYP dostarczoną przez producenta mikrosomów, a szybkością metabolizmu badanego leku. W badaniu tym szybkość reakcji korelowała jedynie z aktywnością izoenzymu CYP3A4. Czy zdaniem Doktorantki wykonanie badania, którego celem byłoby zmierzenie aktywności pozostałych izoenzymów w warunkach eksperymentalnych poprawiłoby korelację?

W kolejnej części pracy przedstawiono wyniki udziału specyficznych inhibitorów CYP w metabolizmie lewomepromazyny w mikrosomach wątrobowych, wykazując w przypadku stężenia terapeutycznego tego leku istotny udział CYP3A4, przy mało istotnym udziale pozostałych izoenzymów, natomiast przy stężeniu toksycznym leku zaobserwowano istotne zmniejszenie udziału CYP3A4. Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić przyczynę tej rozbieżności? Czy zdaniem Autorki uzyskane wartości klirensu wewnętrznego tego leku *in vitro* pozwalają na przewidywanie klirensu całkowitego lewomepromazyny *in vivo*?

W rozdziale poświęconym dyskusji wyników Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę uzyskanych wyników, konfrontując badania własne z osiągnięciami innych zespołów badawczych. Autorka wykazała, że lewomepromazyna jest substratem oraz inhibitorem enzymatycznym, a w wyższych stężeniach także induktorem. Solidny przegląd literatury w zestawieniu z krytycznym podejściem do uzyskanych wyników pozwolił na sprecyzowanie wiodącego udziału izoenzymu CYP3A4 w reakcji 5-sulfoksydacji i N-demetylacji lewomepromazyny.

Po lekturze tego rozdziału nasuwa się następujące pytanie. Czy stwierdzone zjawisko prawdopodobnej interakcji lewomepromazyny z innymi lekami – substratami dla izoenzymu CYP3A4 może być wykorzystane w praktyce klinicznej jako farmakoterapia wielolekowa, której celem jest zwiększenie siły działania farmakologicznego i uzyskanie pożądanego efektu terapeutycznego, przy jednoczesnym zmniejszeniu dawek poszczególnych leków? Czy takie postępowanie zmniejszy prawdopodobieństwo wystąpienia działań niepożądanych, i czy może być korzystne dla chorego?

Na podkreślenie zasługuje bardzo staranna analiza merytoryczna uzyskanych wyników kinetyki enzymatycznej i poprawne wyciągnięcie wniosków, co zostało przedstawione w sposób spójny i czytelny.

W przedstawionej pracy badania zaplanowano w sposób przemyślany, wyniki przedstawiono w sposób jasny i precyzyjny, a dyskusja jest merytoryczna i oparta na odpowiednio dobranych anglojęzycznych pozycjach literaturowych.

Pod względem edytorskim, pomimo kilku potknięć, praca została zredagowana bardzo starannie. Pracę charakteryzuje duży ładunek naukowy oraz potencjalna wartość aplikacyjna uzyskanych wyników badań. Wyniki, które oceniam bardzo wysoko, świadczą o samodzielności naukowej i badawczej Autorki, swobodzie poruszania się w zagadnieniach z obszaru farmakokinetyki i metabolizmu leków, umiejętności rozwiązywania problemów metodologicznych, a także o jej dużej pracowitości i rzetelności badawczej. Uzyskane wyniki w znacznym stopniu poszerzają wiedzę w obszarze metabolizmu lewomepromazyny. Rozprawa jest skonstruowana w sposób estetyczny i przejrzysty. Doktorantka swobodnie posługuje się precyzyjnym językiem naukowym i adekwatnie stosuje terminologię związaną z przedmiotem pracy.

W pracy nie znaleziono błędów stylistycznych, interpunkcyjnych, ortograficznych lub gramatycznych, jedynie drobne błędy literowe, jak niepoprawny zapis teofiliny na str. 11, chromosom i glucocorticoid na str. 12, artemizyna na str. 13, Supelcosil na str. 47. W spisie literatury zauważono pewną niekonsekwencję w przytaczaniu skrótów nazw czasopism, tj. z kropką lub bez kropki, spowodowaną najprawdopodobniej stosowaniem jednego z programów do automatycznego wprowadzania referencji, a które niestety często wprowadzają błędy edytorskie. Poza tym na stronie 82 powinno być „Endocrinology”, w pozycji 53 piśmiennictwa brakuje tytułu czasopisma, w którym opublikowano pracę. Powyższe komentarze nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

## **Podsumowanie**

Reasumując należy stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Basińskiej-Ziobroń jest oryginalnym i kompleksowym opracowaniem dotyczącym oceny metabolizmu wątrobowego lewomepromazyny. Badania zawierają szereg elementów nowatorskich, zostały wykonane metodycznie poprawnie, z użyciem odpowiednich narzędzi badawczych, a Doktorantka przy ich wykonywaniu i opracowywaniu wyników wykazała się odpowiednią wiedzą merytoryczną i umiejętnościami analitycznymi. Wyniki badań zostały opublikowane w trzech publikacjach, w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, takich jak *Pharmacological Reports* (2015) - w pracy tej Doktorantka jest pierwszym autorem, *Biochemical Pharmacology* (2014) oraz *Pharmacological Reports* (2014) - w których jest drugim autorem.

Podjęte badania są niezwykle ważne ze względu na możliwość aplikacji klinicznej uzyskanych wyników. Wymiernym efektem dysertacji mgr inż. Agnieszki Basińskiej-Ziobroń jest dostarczenie informacji pozwalających na zwiększenie bezpieczeństwa stosowania lewomepromazyny u pacjentów. Z uwagi na fakt, że lek ten charakteryzuje się dużą zmiennością międzysobniczą, w konsekwencji interakcji farmakokinetycznych można zaobserwować wystąpienie efektów toksycznych tego leku lub też zmniejszoną skuteczność leczenia. Dlatego też podjęte w pracy doktorskiej przez mgr inż. Agnieszkę Basińską-Ziobroń zadanie oceny metabolizmu lewomepromazyny w wątrobie wpisuje się w aktualny nurt badań, a tematyka poruszana przez Autorkę ma znaczenie praktyczne, w dziedzinach związanych ze zdrowiem człowieka, szczególnie w aspekcie stosowania tego neuroleptyku u chorych. Biorąc pod uwagę zakres prac, uzyskane przez Doktorantkę wyniki należy uznać za znaczącą nowość naukową i niewątpliwie duże jej osiągnięcie badawcze.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania przedstawione w rozprawie doktorskiej były finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Opus 1, Preludium 8 oraz funduszy statutowych Zakładu Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie.

We wniosku końcowym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, pt. „Interakcje lewomepromazyny, neuroleptyku o szerokim spektrum działania klinicznego, z ludzkim wątrobowym cytochromem P450” cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość aplikacyjną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Doktorantkę. Rozprawę doktorską oceniam wysoko, uważam za interesującą i ważną w kontekście zastosowań klinicznych lewomepromazyny. Dysertacja mgr inż. Agnieszki Basińskiej-Ziobroń w pełni odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. – O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dziennik Ustaw RP nr 65, poz. 595 z dnia 16 kwietnia 2003 r.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie o dopuszczenie mgr Agnieszki Basińskiej-Ziobroń do publicznej obrony tez przedstawionych w dysertacji. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoki poziom przedstawionej dysertacji zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy (wniosek załączam w osobnym piśmie).

dr hab. n. farm. Maria Walczak, prof. UJ





UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

## Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

### Wydział Farmaceutyczny

Dr hab. n. farm. Maria Walczak, prof. UJ  
Katedra i Zakład Toksykologii  
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków  
e-mail: [maria.walczak@uj.edu.pl](mailto:maria.walczak@uj.edu.pl); tel. +4812/6205630

### WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Basińskiej-Ziobroń. Tytuł rozprawy: „Interakcje lewomepromazyny, neuroleptyku o szerokim spektrum działania klinicznego, z ludzkim wątrobowym cytochromem P450”. Przedstawiona do recenzji praca prezentuje wysoki poziom merytoryczny, wpisuje się w światowe trendy związane z badaniami nad interakcjami lekowymi w aspekcie oddziaływania z cytochromem P450. W badaniach zastosowano bogaty warsztat badawczy, praca posiada istotne walory poznawcze, a uzyskane wyniki mają potencjał aplikacyjny. Przedstawione w monografii wyniki ukazały się już w postaci publikacji naukowych, w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym:

1. Basińska-Ziobroń A., Daniel W.A., Wójcikowski J.: Inhibition of human cytochrome P450 isoenzymes by a phenothiazine neuroleptic levomepromazine: An in vitro study. *Pharmacol. Rep.* 2015, 67, 1178-1182. doi: 10.1016/j.pharep.2015.04.005. Epub 2015 Apr 23.
2. Wójcikowski J, Basińska A, Daniel WA.: The cytochrome P450-catalyzed metabolism of levomepromazine: a phenothiazine neuroleptic with a wide spectrum of clinical application. *Biochem Pharmacol.* 2014 Jul 15;90(2):188-95. doi: 10.1016/j.bcp.2014.05.005.
3. Wójcikowski J, Basińska A, Boksa J, Daniel WA.: The influence of amitriptyline and carbamazepine on levomepromazine metabolism in human liver: an in vitro study. *Pharmacol Rep.* 2014 Dec;66(6):1122-6. doi: 10.1016/j.pharep.2014.07.012.

Z wyrazami szacunku

*Maria Walczak*