

Prof. dr hab. n. med. Ewa M. Urbańska
p.o. Kierownika Katedry Farmakologii
Doświadczalnej i Klinicznej,
Uniwersytet Medyczny w Lublinie,
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin

Lublin, 3.01.2023

Ocena osiągnięcia naukowego

**„Udział cytochromu P450 (CYP) w metabolizmie substratów istotnych dla prawidłowego funkcjonowania mózgu. Znaczenie fizjologiczne i farmakologiczne.”
w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne**

**Pani dr n. med. Annie Haduch,
adiunktowi w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie**

Niniejsza opinia powstała w związku z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk, nr 6/Z/2022, w sprawie powołania Komisji Habilitacyjnej i wyznaczenia recenzentów w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego Pani **dr n. med. Annie Haduch**, zgodnie z **Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022, poz. 574, z późniejszymi zmianami)**, zwanej dalej Ustawą. Recenzja została sporządzona na podstawie dokumentacji papierowej nadesłanej przez Dyrektora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

1. Sylwetka zawodowa Habilitantki

Pani dr Anna Haduch jest absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Stopień magistra biologii uzyskała w 1995 r., w oparciu o pracę magisterską pt.: „Behawioralna reakcja samic na różne dawki chemosygnaliów zawartych w moczu samców nornicy rudej (*Clethrionomys glareolus*)” przeprowadzoną pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Anny Marchlewskiej-Koj. W tym samym roku związała swą karierę zawodową z Zakładem Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, początkowo na stanowisku pracownika inżynieryjno-technicznego (1995-2004), następnie asystenta (2005-2011), a

od 2011 r. do chwili obecnej adiunkta. Stopień doktora nauk medycznych uzyskała w 2004 r., na podstawie rozprawy doktorskiej: „Wpływ leków psychotropowych na aktywność izoenzymów rodziny drugiej i trzeciej cytochromu P-450”, wykonanej pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. n. med. Władysławy Anny Daniel.

Pani dr Anna Haduch podnosiła swe kwalifikacje zawodowe uczestnicząc w czterech kilkudniowych szkoleniach w ośrodkach zagranicznych w Danii, Hiszpanii, na Węgrzech i w Niemczech, odpowiednio w roku 1998, 2002, 2004 oraz 2022.

2. Ocena osiągnięcia naukowego

Habilitantka przedstawiła do oceny jako osiągnięcie naukowe cykl powiązanych tematycznie publikacji, zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie artykułu 267 w/w Ustawy ust.2 p.2. Osiągnięcie, zawierające 6 wieloautorskich prac oryginalnych oraz 1 pracę pogładową, zostało przedstawione pod wspólnym tytułem „*Udział cytochromu P450 (CYP) w metabolizmie substratów istotnych dla prawidłowego funkcjonowania mózgu. Znaczenie fizjologiczne i farmakologiczne.*” Zawarte w nim publikacje ukazały się drukiem w latach 2013-2022, w renomowanych czasopiśmie z listy filadelfijskiej: *Pharmacol Res (1)*, *J Neurochem (1)*, *Drug Metabol Dispos (1)*, *Biochem Pharmacol (1)*, *Neurochem Int (2)*, *Drug Metab Rev (1)*, których współczynniki oddziaływania (IF) w roku opublikowania wynosiły od 3.842 do 4.825.

Pani dr Anna Haduch jest pierwszym autorem zarówno publikacji oryginalnych jak i pracy przeglądowej. Kopie stosownych oświadczeń współautorów zamieszczone w Autoreferacie (załącznik nr 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego) jednoznacznie wskazują, że Habilitantka pełniła wiodącą rolę w współtworzeniu koncepcji badań, planowaniu i przeprowadzaniu eksperymentów, opracowywaniu danych i analizie statystycznej oraz sporządzaniu rycin, tabeli i przygotowywaniu manuskryptów. Należy podkreślić, że w ujęciu parametrycznym wartość zgłoszonego od oceny osiągnięcia jest wysoka, o czym świadczy łączny IF cyklu wynoszący **29.429** (385 punktów wg. punktacji MNiSW).

Omówienie osiągnięcia naukowego zawarte w Autoreferacie (Punkt 4.3, paragrafy 4.3.1.-4.3.7) w sposób jasny i klarowny przedstawia założenia, którymi kierowała się Habilitantka planując pracę badawczą oraz prezentuje i analizuje uzyskane wyniki w oparciu o dostępne piśmiennictwo. Interesujący i rzeczowy wstęp wprowadza czytelnika w tematykę będącą osią całego osiągnięcia – rolę i funkcjonowanie w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) grupy enzymów zawierających hem i należących do rodziny cytochromu P540 (CYP).

Enzymy CYP są odpowiedzialne za metabolizm około 70 - 80 % leków stosowanych w praktyce klinicznej. Oprócz klasycznej lokalizacji wątrobowej, izoformy CYP ulegają ekspresji także w mózgu, w komórkach glejowych i neuronalnych. Ośrodkowa aktywność P450 jest istotnym elementem metabolicznej bariery chroniącej mózg przed napływem ksenobiotyków. CYP pełni też znaczącą rolę w biochemicznych przemianach neuroprzekaźników, neurosteroidów, czy eikozanoidów, przez co pośrednio moduluje czynność neuronalną. W porównaniu do izoform wątrobowych, ośrodkowe izoformy CYP cechuje wysoce specyficzny dla danej struktury mózgu stopień ekspresji, odmienna lokalizacja subkomórkowa oraz swoista wrażliwość na czynniki regulujące. Uważa się, iż zaburzenia ekspresji lub nieprawidłowe funkcjonowanie CYP są jednym z elementów łańcucha zmian prowadzących do wystąpienia zmian neurodegeneracyjnych, otępiennych czy zaburzeń afektywnych. Habilitantka zwróciła więc szczególną uwagę na serotoninę, monoaminowy pochodną tryptofanu, pełniącą rolę neuroprzekaźnika zarówno na obwodzie jak i w OUN. Układ serotonergiczny moduluje szeroką gamę procesów, w tym łaknienie, napięcie naczyń mózgowych oraz pełni znaczącą rolę w regulacji nastroju oraz uczenia się zapamiętywania. Zaburzenia przekazywania serotonergicznego są istotnym elementem patogenezy zaburzeń kognitywnych, chorób lękowych czy depresji.

Pani dr Anna Haduch podjęła się poszukiwań nowej drogi syntezy serotoniny w obrębie OUN, zakładając iż aktywność CYP2D może prowadzić do jej powstawania w wyniku demetylacji 5-metoksytryptaminy również poza wątrobą. Ponadto, Habilitantka postanowiła zbadać rolę CYP2D w funkcjonowaniu mózgu w warunkach fizjologicznych oraz w modelu zwierzęcym depresji. Dostępne wyniki badań klinicznych wskazują, że niska aktywność CYP2D6 jest powiązana z dysfunkcją osobowości np. pod postacią zaburzeń lękowych, odraczaniem gratyfikacji czy impulsywnością. Cel, który postawiła przed sobą Habilitantka należy więc uznać za w pełni uzasadniony, o dużym znaczeniu poznawczym oraz niosący implikacje kliniczne.

Pierwsza publikacja cyklu (*Pharmacol Res* 2013, 67:53-59) przedstawia wyniki badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* wskazujące, iż zarówno rekombinowane enzymy podrodziny 2D jak i frakcje mikrosomalne otrzymane z różnych struktur mózgowia efektywnie metabolizują 5-metoksytryptaminę. Specyficzność reakcji potwierdzono stosując inhibitory CYP2D, chininę i fluoksetynę. Ponadto ujawniono, że efektywność ludzkiego CYP2D jest znacząco wyższa niż enzymu pochodzenia szczurzego.

W następnym etapie badań Habilitantka analizowała powstawanie serotoniny przy współdziałaniu CYP2D w warunkach *in vivo* stosując metodykę mikrodializ śródmózgowych (Publikacja 2 - *J Neurochem* 2015, 133:83-92). Zastosowanie substratu CYP2D, 5-metoksytryptaminy, w połączeniu z inhibitorem hydroksylazy tryptofanu, umożliwiło

zaobserwowanie funkcjonalności nowego szlaku syntezy serotoniny. Habilitantka słusznie podkreśla, iż aktywność tej ścieżki w warunkach fizjologicznych jest najprawdopodobniej niewielka, jednakże, w warunkach genetycznie uwarunkowanego osłabienia ekspresji hydroksylazy tryptofanowej lub indukcji CYP2D np. pod wpływem przewlekłego nadużywania alkoholu lub w wyniku stosowania niektórych leków, może być źródłem powstawania znaczących ilości serotoniny. W kolejnej publikacji cyklu dr Anna Haduch wykazała, że dootrzewnowe podanie melatoniny, prekursora 5-metoksytryptaminy, nasila mózgowe powstawanie serotoniny w warunkach osłabionego funkcjonowania klasycznego szlaku tryptofan-serotonina (Publikacja 3 - *Drug Metab Dispos* 2016, 44:445-452).

Logicznym następstwem wcześniej uzyskanych wyników była ocena ośrodkowej aktywności CYP2D w zwierzęcym modelu depresji (Publikacja 4 - *Biochem Pharmacol* 2018, 156:398-405). U szczurów poddanych przewlekłemu łagodnemu stresowi (*chronic mild stress* - CMS) zaobserwowano istotny wzrost aktywności CYP2D we frakcji mikrosomalnej hipokampa, ale nie kory mózgowej, podwzgórza, pnia mózgu czy mózdzku. Taka selektywna modulacja aktywności CYP2D jest interesująca w świetle szczególnej wrażliwości hipokampa na stres. Habilitantka ujawniła także nowy aspekt działania leków przeciwdepresyjnych wykazując, iż przewlekłe zastosowanie wenlafaksyny lub escitalopramu w modelu CMS zwiększa podwzgórzową, korową i mózdkową aktywność cytochromu. Natomiast aktywność CYP2D w hipokampie uległa intensyfikacji jedynie w wyniku przewlekłego podawania escitalopramu.

Asumptem do kolejnych badań stały się dane literaturowe wskazujące, iż w procesie starzenia się dochodzi do obwodowego spadku aktywności CYP2D oraz wzrostu poziomu białka CYP2D w niektórych okolicach mózgu ludzkiego, przy braku informacji o jego rzeczywistej czynności enzymatycznej. Habilitantka przeprowadziła eksperymenty na transgenicznym szczurach, samcach szczepu Dark Agouti pozbawionych genu hydroksylazy tryptofanowej uzyskując bardzo interesujące wyniki (Publikacja 5 - *Neurochem Int* 2020, 141:104884). Wykazała mianowicie, że u starzejących się zwierząt typu dzikiego korowa aktywność CYP2D wzrasta, podczas gdy w hipokampie, podwzgórzu i prążkowie spada. Natomiast u zwierząt transgenicznych, z ośrodkowym niedoborem serotoniny, wraz z wiekiem zwiększa się aktywność CYP2D w korze czołowej, przy braku zmian w pozostałych badanych strukturach. Logiczną kontynuacją powyższych badań była ocena zmian aktywności CYP2D w mózgu samic szczepu Dark Agouti (Publikacja 6 - *Neurochem Int* 2022, 152:105223). Habilitantka ujawniła odmienny wzorzec zmian aktywności CYP2D w mózgu starzejących się zwierząt, zarówno typu dzikiego jaki i transgenicznych. Są to interesujące dane, szczególnie biorąc pod uwagę wyższą ogólną zapadalność kobiet na depresję. Jednakże, u osób po 60 roku życia różnice w występowaniu depresji pomiędzy obu płciami niwelują się. Z tego punktu

widzenia niższa aktywność CYP2D w warunkach niedoboru serotoniny wskazuje, że w miarę starzenia się u płci żeńskiej zanika zdolność regulacji metabolizmu chroniąca przed spadkiem nastroju. Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie dla planowania celowanej i bardziej efektywnej terapii chorób OUN.

Uzupełnieniem prac cyklu jest publikacja przeglądowa stanowiąca kompendium wiedzy na temat roli mózgowego cytochromu P450 w schorzeniach OUN (Publikacja 7 – *Drug Metabol Rev* 2018, 50:415-429).

Reasumując, przedstawione do oceny przez Panią dr Annę Haduch osiągnięcie będące spójnym tematycznie cyklem publikacji stanowi bardzo istotny wkład w rozwój neurofarmakologii, bezsprzecznie spełniając wymogi Ustawy. Habilitantka osiągnęła założone cele badawcze stosując adekwatne techniki eksperymentalne *in vitro* oraz *in vivo*, świadczące o Jej doskonałym warsztacie doświadczalnym. Uzyskane wyniki zawierają elementy o charakterze nowatorskim, wnoszą informacje o niebagatelnym znaczeniu poznawczym i potencjalnych implikacjach praktycznych oraz świadczą o dojrzałości Habilitantki do prowadzenia samodzielnych badań.

3. Ocena aktywności naukowej

Zgodnie z załączoną analizą bibliometryczną, całkowity dorobek publikacyjny dr Anny Haduch obejmuje 48 współautorskich prac oryginalnych i przeglądowych, w tym 47 publikacji w recenzowanych czasopismach z listy JCR takich jak m.in.: *British Journal of Pharmacology*, *European Neuropsychopharmacology*, *Journal of Neurochemistry*, *Neurochemistry International*, *Drug Metabolism & Disposition*, *Biochemical Pharmacology*, *Pharmaceutics*, *Brain Research* czy *Pharmacological Reports* o łącznym **IF = 134,74** (1681 punktów MNiSW).

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora powstało 11 prac oryginalnych, w tym 10 posiadających IF (łącznie IF=**14,688**). Po uzyskaniu stopnia doktora Habilitantka znacząco powiększyła swój dorobek i opublikowała 37 prac (34 prace oryginalne oraz 3 przeglądowe), wszystkie w czasopismach z IF (IF=**120,046**). Co istotne, Habilitantka była pierwszym autorem 1 publikacji w okresie przed uzyskaniem stopnia doktora, a 17 po jego uzyskaniu.

Należy podkreślić, że od momentu złożenia wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dorobku naukowym Pani dr Anny Haduch pojawiły się kolejne 2 publikacje: praca przeglądowa opublikowana w *Biochemical Pharmacology* (IF=5,858) oraz praca oryginalna, która ukazała się w *International Journal of Molecular Sciences* (IF=5,542). Tym samym, całkowity dorobek obejmuje 50 publikacji o sumarycznym **IF=146,14** (stan na dzień 3.01.2023, wg analizy recenzenta).

Pragnę dodać, że średni IF dorobku Pani dr Anny Haduch wyniósł 1,33 w okresie przed doktoratem, a po uzyskaniu stopnia doktora został niemal potrojony i osiągnął wartość 3,37 (z uwzględnieniem najnowszych publikacji). W ujęciu parametrycznym, jest to pożądany i bardzo korzystny wzrost wskaźników bibliometrycznych dorobku naukowego.

Według bazy Web of Science (dane w załączonej analizie bibliometrycznej), publikacje współautorstwa Habilitantki były cytowane 533 razy, a indeks Hirscha wynosi 17, co należy uznać za wartości wysokie, wskazujące na szerokie zainteresowanie środowiska naukowego wynikami badań Pan dr Anny Haduch.

Równie wysoko oceniam umiejętności organizacji i prowadzenia badań w zespole przez Panią dr Annę Haduch. Habilitantka była kierownikiem projektu realizowanego w oparciu o fundusze uzyskane z MEiN (2005-2008). Uzyskane wyniki stały się podstawą 3 publikacji, które ukazały się w *Eur J Pharmacol* (2) oraz w *J Neurochem* (1). Uczestniczyła również w wykonywaniu 7 innych projektów, w tym finansowanych przez KBN, MNiSW, grantu współfinansowanego przez Unię Europejską i MNiSW w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka oraz grantów NCN OPUS6 i OPUS12.

Imponujący i spójny całkowity dorobek naukowy Habilitantki jest doskonałym przykładem konsekwentnej realizacji zainteresowań badawczych. Pani dr Anna Haduch jest bez wątpienia ekspertem w dziedzinie roli cytochromu P450 w fizjologii i patologii OUN, doskonale przygotowanym do prowadzenia dalszej, samodzielnej aktywności badawczej.

4. Ocena dorobku dydaktycznego, organizacyjnego i popularyzatorskiego oraz współpracy międzynarodowej

Habilitantka przekazywała swe umiejętności badawcze studentom Inżynierii Biomedycznej AGH oraz Neurobiologii UJ, magistrantom i doktorantom. Recenzowała prace oryginalne dla kilku uznanych czasopism naukowych oraz głosiła wykłady na zaproszenie. Jest członkiem komitetu organizacyjnego 5th Central European Biomedical Congress, który odbędzie się w Krakowie w dniach 29.05-1.05.2023 pod hasłem „Future Trends in Health Interventions”.

Pani dr Anna Haduch aktywnie upowszechniała wiedzę naukową poprzez udział w Festiwalu Nauki w Krakowie i publikacje popularnonaukowe. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego, Europejskiego Związku Towarzystw Farmakologicznych oraz Międzynarodowej Unii Farmakologii Podstawowej i Klinicznej. Uznanie budzi także aktywność dr Anny Haduch w upowszechnianiu wyników swoich badań poprzez ich prezentację na uznanych i renomowanych konferencjach międzynarodowych i krajowych.

Pani dr Anna Haduch umiejętnie rozwija współpracę z zagranicznymi ośrodkami naukowymi, w tym z Instytutem Chemii Węgierskiej Akademii Nauk w Budapeszcie, Centrum Medycyny Molekularnej im. Maxa Delbrucka w Berlinie, Instytutem Fizjologii Molekularnej i Genetyki w Bratysławie oraz Uniwersytetem Masaryka w Brnie, realizując wspólne projekty dotyczące funkcjonowania cytochromu P450.

Wniosek końcowy

Przedstawione do oceny osiągnięcie Pani dr n. med. Anny Haduch, adiunkta w Zakładzie Farmakokinetiki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie, pt. „Udział cytochromu P450 (CYP) w metabolizmie substratów istotnych dla prawidłowego funkcjonowania mózgu. Znaczenie fizjologiczne i farmakologiczne.” w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego, stanowi spójny, powiązany tematycznie cykl artykułów naukowych wnoszący istotne informacje o znaczeniu poznawczym i potencjalnie aplikacyjnym do dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscypliny nauk medycznych. Z przyjemnością stwierdzam, że powyższe osiągnięcie spełnia wymogi stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022, poz. 574 z późniejszymi zmianami).

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową przedstawionego do oceny osiągnięcia oraz znaczący, całkowity dorobek naukowy i dokonania dydaktyczno-organizacyjne Habilitantki, z satysfakcją **wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie o dopuszczenie Pani dr Anny Haduch do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauk medycznych.**



Prof. dr hab. n. med. Ewa M. Urbańska