



# GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

## Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. Paweł Wiczling  
Zakład Biofarmacji i Farmakokinetiki  
Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki  
Al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk  
e-mail: [wiczling@gumed.edu.pl](mailto:wiczling@gumed.edu.pl)  
tel.: 58-349-14-94

## RECENZJA

### Rozprawy doktorskiej mgr. Artura Świerczka

**pt.: „Badania farmakokinetyczno–farmakodynamiczne inhibitorów fosfodiesteraz – lizofiliny i związku GRMS-55 o właściwościach przeciwzapalnych i immunomodulujących”**

**wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Wyskiej, kierownika Zakładu Farmakokinetiki i Farmacji Fizycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie**

Modelowanie farmakokinetyczno-farmakodynamiczne (PK/PD) jest pomocne w ilościowym opisie zależności pomiędzy dawką, stężeniem i efektem działania leku. Ten sposób interpretacji danych odgrywa dużą rolę w procesie wprowadzania nowych leków na rynek, zarówno na etapie badań przedklinicznych, jak i w kolejnych fazach mających na celu dowieść bezpieczeństwa i skuteczności potencjalnego leku. O istotności tego rodzaju podejścia świadczy duża liczba prac publikowanych w czasopismach naukowych przez osoby pracujące na uniwersytetach i w przemyśle farmaceutycznym. Tematyka recenzowanej pracy doktorskiej wpisuje się w ten nurt badań naukowych. Praca miała na celu ocenę i porównanie aktywności farmakologicznej oraz właściwości farmakokinetycznych dwóch inhibitorów fosfodiesterazy (PDE): lizofiliny oraz związku GRMS-55 w oparciu o serię badań *in vitro* i *in vivo*. W interpretacji tych badań posłużono się wnioskiem statystycznym opartym o modelowanie farmakokinetyczno-farmakodynamiczne. Praca doktorska obejmowała eksperymenty u myszy, szczurów i ludzi, różne zwierzęce modele doświadczalne chorób zapalnych i autoimmunologicznych oraz różne formy analizy statystycznej.

Praca doktorska mgr. Artura Świerczka ma często spotykany układ dla tego typu opracowań. Jest złożona z monografii, która jest skrótowym opisem przeprowadzonych badań naukowych. Natomiast szczegółowy opis znajduje się w czterech załączonych publikacjach naukowych. Monografia napisana jest w języku polskim. Obejmuje 74 strony i składa się ze wstępu, założeń i celu pracy, metodyki oraz wyników, dyskusji wyników i wniosków. Pracę doktorską autor rozpoczął od podziękowań, następnie wymienił źródła finansowania oraz listę nawiązywanych współprac z innymi ośrodkami badawczymi. Następnie przedstawił spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, listę publikacji oraz wykaz skrótów. Pracę doktorską kończy spis piśmiennictwa, przedruk trzech oryginalnych i jednej przeglądowej pracy naukowej autorstwa lub współautorstwa mgr. Artura Świerczka oraz zbiór oświadczeń wszystkich współautorów poszczególnych prac. Oświadczenie zawierają procentowy indywidualny wkładu każdego ze współautorów w powstanie każdej z prac i potwierdzają dużym wkład mgr. Artura Świerczka w przygotowanie każdej z prac. Przypisy literaturowe obejmują 115 pozycji. Są one w zdecydowanej większości opublikowane po 2000 roku w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Wstęp jest dobrze przedstawionym wprowadzeniem do zagadnień poruszanych w rozprawie doktorskiej. Z dużym zainteresowaniem przeczytałem poszczególne rozdziały, gdzie przejrzyste i w sposób możliwie zwięzły zostały opisane podstawowe fakty dotyczące chorób zapalnych i autoimmunologicznych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, autoimmunologiczne zapalenie wątroby i sepsa. W dalszej kolejności autor omówił fosfodieasterazy z podziałem na typy, znane inhibitory tych enzymów oraz znaczenie tych enzymów jako celem farmakologicznym. Na końcu wstępu omówił podstawowe założenia modelowania farmakokinetyki i farmakodynamiki leków. W mojej opinii część dotycząca wnioskowania z danych jest opisana bardzo pobieżnie, chociaż była wykorzystywana przez autora jako podstawowe narzędzie w interpretacji danych eksperymentalnych. W tej części autor, opisując model  $E_{max}$ , niepoprawnie tłumaczy znaczenie parametrów  $I_{max}$  i  $E_{max}$ . Są one oznaczone na wykresie jako wartości minimalne i maksymalne efektu  $E$ . Nie koresponduje to jednak z wcześniej podanymi równaniami (1) i (2) z których wynika, że  $I_{max}$  i  $E_{max}$  oznaczają wzrost/obniżenie efektu względem efektu obserwowanego dla stężeń równych zero. Nie są one w każdym razie efektami maksymalnym i minimalnym. Są nimi  $E_0 + E_{max}$  i  $E_0 - I_{max}$ .

W kolejnej części pracy doktorskiej Autor sformułował cel badań. W mojej ocenie cel przedstawiony na stronie 34 i w kilku dalszych miejscach rozprawy, niepotrzebnie odwołuje się do formuły stosowanej podczas testowania hipotez statystycznych. Cytując autora, celem

pracy była „weryfikacja hipotezy, iż wyselekcjonowane inhibitory PDE o korzystnym profilu hamowania poszczególnych typów enzymów mogą stanowić skuteczny i bezpieczny sposób leczenia wybranych chorób immunologicznych”. W mojej ocenie takie sformułowanie celu pracy wymaga podania hipotezy jako stwierdzenia, a nie jako przypuszczenia. Trudno badać hipotezę, która sprowadza się do oceny tego czy nowo testowana substancja **może** działać, ponieważ na takie pytanie odpowiedź zawsze jest twierdząca. Każda nowo badana substancja może działać na praktycznie wszystkie procesy biologiczne. Ważne jest określenie jaka jest wielkość tego efektu dla konkretnej dawki i na ile ten efekt jest powtarzalny w czasie i w przestrzeni. Innymi słowy na ile uogólnia się obserwowany efekt działania leku. W dalszej części autor podaje inaczej, i moim zdaniem poprawniej, sformułowany cel pracy, którym była ocena aktywności dwóch inhibitorów PDE w wybranych modelach zwierzęcych chorób o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym, a także porównanie właściwości PK/PD badanych związków. Samo opracowanie modelu (czyli zaproponowanie teorii tłumaczącej badane zjawisko) i oszacowanie parametrów (ich wielkości oraz niepewności) jest w mojej ocenie wystarczającym celem pracy naukowej.

W dalszej kolejności autor wymienił siedem celów szczegółowych, które pokazują ambitny plan przyświecający tej pracy. Metodyka obejmuje opis eksperymentów *in vitro* i *in vivo*, podaje użyte metody analityczne i statystyczne. Metody związane z użytymi technikami eksperymentalnymi są opisane w sposób skrupulatny. Niestety opis analizy statystycznej sprowadził się do wymieniania wykorzystanych programów komputerowych. W mojej ocenie jest to niewystarczające. Można powiedzieć, że wymienienie nazw programów jest tym samym co wymienienie aparatury wykorzystanej do oznaczeń analitycznych bez podania warunków przeprowadzenia tych analiz. Taka praktyka utrudnia interpretację wyników, szczególnie w przypadku użycia nieszablonowych analiz. Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań naukowych zostały opisane osobno dla każdej z prac będących częścią cyklu. Z kolei dyskusja wyników oraz wnioski zostały ujęte w postaci syntetycznego opisu całości badań.

W pierwszej pracy (*Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*) autor ocenił możliwości użycia cAMP jako markera odpowiedzi farmakologicznej po podaniu pentoksyfiliny (PTX) i dwóch enancjomerów lisofiliny (LSF), ocenił farmakokinetykę tych substancji poprzez opracowanie modeli farmakokinetycznych oraz ocenił interakcję tych substancji z użyciem modelowania PK/PD oraz testu *in vitro*. Wyniki zdaniem autora, pokazały, że obydwa enancjomery LSF są aktywne względem PDE4B i PDE7A. Wykazał

również, że LSF i PTX wykazują interakcję jako inhibitory PDE4B *in vitro* jak i związki hamujące rozkład cAMP *in vivo*. Autor zaproponował również model opisujący farmakokinetykę LSF i PTX oraz model farmakodynamiczny odpowiedzi pośredniej dla cAMP, pozwalający na ilościową oceną działania LSF i PTX. Praca przedstawia dużo wartościowych danych eksperymentalnych i wniosków. Dopatrzyłem się jednak kilku niedociągnięć. W mojej ocenie najbardziej problematyczne jest opracowanie osobnych modeli farmakokinetycznych dla LSF i PTX. Ponieważ substancje ulegają wzajemnej konwersji w organizmie, zdecydowanie poprawniej jest opracować model, który jednocześnie opisuje farmakokinetykę obu substancji. W takim modelu parametry modelu byłyby niezależne od tego, która substancja została podana. Osobne modele prowadzą do nielogicznych wniosków, typu obecność eliminacji Michaelis-Menten po podaniu jednego ze związku. Dużą trudność napotkałem również próbując interpretować parametry modelu, ponieważ oznaczenia symbolów nie są spójne pomiędzy modelami, np.  $k_{em}$  opisuje stałą szybkości eliminacji LSF i stałą szybkości eliminacji PTX. Również obecność kinetyki Michaelisa-Mentena nie została moim zdaniem jednoznacznie potwierdzona przez autora. Nie znalazłem porównania pomiędzy modelami uwzględniającymi eliminację MM i eliminację I-go rzędu. Mimo wymienionych uwag opracowane modele nadają się do celów związanych z predykcją i tym samym nie obciążają zbyt wielu wniosków otrzymanych w części dotyczącej modelowania farmakodynamiki tych substancji.

Drugim aspektem pracy budzącym moje wątpliwości jest ocena interakcji LSF i PTX. Autor opisuje addytywną interakcję modelem, który zakłada dwa niezależne mechanizmy działania. A przecież niezależność działania LSF i PTX nie jest zgodna ze znanym mechanizmem działania tych substancji i wnioskami płynącymi z badań *in vitro*, które sugerują interakcję addytywną wg Loewego. Nie rozumiem również dlaczego autor opisał addytywną interakcję leków zakładając tę samą wartość  $IC_{50}$  dla obu związków. Poniżej przedstawiam równania opisujące te dwa modele interakcji w sytuacji gdy współczynnik Hilla równa się jeden:

- 1) Model addytywny (Loewe additivity model) ma postać:

$$I(t) = 1 - \frac{I_{max} \left( \frac{C_1}{IC_{50,1}} + \frac{C_2}{IC_{50,2}} \right)}{\frac{C_1}{IC_{50,1}} + \frac{C_2}{IC_{50,2}}}$$

- 2) Model zakładający niezależność działania (*Bliss independence model*):

$$I(t) = \left(1 - \frac{I_{max,1}C_1}{C_1 + IC_{50,1}}\right) \left(1 - \frac{I_{max,2}C_2}{C_2 + IC_{50,2}}\right)$$

W **drugiej publikacji** (*Xenobiotica*) autor ocenił farmakokinetykę LSF po podaniu dożylnym, dożołądkowym oraz podskórnym z uwzględnieniem stężeń LSF i PTX. A także ocenił wpływ eksperymentalnie wywołanych chorób zapalnych (z wykorzystaniem modelu niewydolności wielonarządowej oraz modelu endotoksemii) na farmakokinetykę tych substancji. Kolejnym celem było odniesienie wyników badań na zwierzętach do wyników badań klinicznych u ludzi. Praca przedstawia dużo wartościowych danych eksperymentalnych i wniosków. Niemniej kilka wniosków przedstawionych w tej pracy wymaga doprecyzowania.

Abstrakt publikacji B rozpoczyna od zdania, które w mojej ocenie jest kontrowersyjne, a mianowicie, że „Despite the number of favourable properties of lisofylline (LSF), clinical trials on this compound have not yielded the expected results yet”. Trzeba jednak pamiętać, że szanse sukcesu w badaniach klinicznych nad nowymi substancjami są małe. Większość substancji, które są obiecujące w fazie przedklinicznej, po przeprowadzeniu badań klinicznych I-III nie mają wystraszającego profilu bezpieczeństwa i skuteczności, żeby stać się lekami. Także paradoksalnie oczekiwanym rezultatem powinien być brak sukcesu w badaniach klinicznych obiecujących kandydatów!

W pracy wartości  $AUC_{0-120}$  została policzona jako pole powierzchni profilu stężenie-czas od zera do ostatniego pomiaru (120 min). Moim zdaniem użycie AUC z uwzględnieniem pola powierzchni od zera do nieskończoności jest bardziej uzasadnione teoretycznie. Nasuwa się tutaj pytanie czy przypadkiem obserwowana nieliniowość, np. po podaniu pozanaczyniowym, nie jest konsekwencją użycia AUC, które jest obciążone błędem systematycznym w różny sposób dla różnych dawek i dróg podania, ponieważ nie uwzględnia części powierzchni od ostatniego pomiaru do nieskończoności? Proszę również zwrócić uwagę, że biodostępność leku, który ulega odwracalnemu metabolizmowi, nie może być (na ogół) poprawnie wyliczona poprzez stosunek AUC dla jednego ze związków. Zależy ona między innymi od AUC drugiego związku. Więcej informacji na ten temat można znaleźć w pracy Cheng H, Jusko WJ. Pharmacokinetics of reversible metabolic systems. *Biopharm Drug Dispos.* 1993 Dec;14(9):721-66.

Prosiłbym również o wyjaśnienie dlaczego w pracy użyto analizy niekompartmentalna do wyznaczania biodostępności pomimo braku spełnienia założeń tej metody, jaką jest

liniowość oraz konieczność eliminacji leku z kompartmentu centralnego? Dużo prościej i poprawniej byłoby uwzględnić biodostępności jako jeden z parametrów modelu. Oczywiście modelu, który wspólnie opisuje stężenia LSF i PTX. Proszę zwrócić uwagę, że brak uwzględnienia biodostępności w modelu, sprowadza się do błędnego założenia, że biodostępność wynosi 100%. Wprowadza to błąd systematyczny w wartościach niektórych parametrów modelu. Może to przekładać na błędy systematyczne w sytuacji użycia modelu do ekstrapolacji, np. podczas symulacji stężeń LSF i PTX po podaniu wielokrotnym.

Interesującym spostrzeżeniem Autora jest fakt, że stężenia LSF obserwowane w badaniach u ludzi z udziałem tej substancji były zbyt niskie względem wartości  $IC_{50}$  u szczura. Autor sugeruje, że zmiana schematu dawkowania leku z podania wielokrotnego w postaci 3 mg/kg co 6 h na ciągłe podanie dożylnie z szybkością 0.08 mg/kg/min byłaby bardziej skuteczna, zakładając podobne wartości  $IC_{50}$  u ludzi i szczurów. Niemniej zwiększenie stężeń zwiększa nie tylko skuteczność ale również ryzyko działań niepożądanych? Problematiczne jest również zestawienie wartości  $IC_{50}$  wyznaczonej dla recematu LSF ze stężeniami jednego z enancjomerów (R(-)-LSF) oraz pominięcie stężeń PTX w tym porównaniu. W mojej ocenie poprawniej byłoby przedstawić oczekiwane wartości stężeń cAMP czy TNF- $\alpha$  wraz z niepewnością po podaniu R(-)-LSF w oparciu o model PK/PD uwzględniający stężenia R(-)-LSF, S(-)-LSF i PTX oraz interakcję między tymi substancjami biorąc pod uwagę dostępne dane od człowieka, szczura i myszy.

**Celem trzeciej z prac** (*Pharmaceutical Research*) było porównanie właściwości PK/PD dwóch inhibitorów fosfodiesterazy o odmiennej aktywności względem poszczególnych typów tego enzymu: LSF oraz związku GRMS-55. Jako związek odniesienia wykorzystano również rolipram. W pracy użyto trzech modeli eksperymentalnych: *i*) model endotoksemii u szczurów Wistar wywołany podaniem LPS, *ii*) model reumatoidalnego zapalenia stawów u szczurów rasy Lewis, wywołany podskórnym podaniem kolagenu typu II, oraz *iii*) model zapalenia wątroby wywołany dożylnym podaniem konkanawaliny A myszom. W mojej ocenie bardzo wartościowe są opracowane przez Autora modele opisujące farmakodynamikę z progresją choroby (stężenie TNF- $\alpha$  i wielkość opuchlizny stawów). Są one opisane w sposób czytelny i ułatwiający zrozumie przeprowadzonych eksperymentów.

W tej pracy, podobnie jak we wcześniejszej, biodostępność została niepoprawnie wyliczona poprzez stosunek AUC dla jednego ze związków (odwracalny metabolizm). Również w tej pracy parametry modelu dla LSF nie uwzględniają biodostępność pomimo obecności podania

dożylnego i podskórnego. Nie umiem również wytłumaczyć dlaczego dyspozycja rolipramu jest opisana różnie w zależności od drogi podania leku: po podaniu dożylnym jest to model dwukompartментowy, natomiast po podaniu pozanaczyniowym jest to model jednokompartментowy. W mojej opinii, celem analizy farmakokinetyczne powinno być szukanie wspólnego opisu całości danych poprzez opracowanie jednego modelu.

W kolejnej **czwartej pracy** (*Current Medicinal Chemistry*) autor i współautorzy mieli na celu podsumowanie stanu wiedzy dotyczącej projektowania, syntezy, właściwości fizykochemicznych, aktywności biologicznej a także zależności struktura-aktywność inhibitorów PDE7 oraz ich potencjalnego zastosowania w leczeniu. Praca ta wzbogaca prezentowane w dysertacji treści.

Podjęta przez mgr. Artura Świerczka tematyka badań wymagała opanowania różnych metod statystycznych, modelowanie z uwzględnieniem progresji choroby, rozumienia złożonych procesów biologicznych związanych z chorobami zapalnymi i autoimmunologicznymi, umiejętności planowania i realizacji złożonych oraz długotrwałych eksperymentów. Zebrane prace dowodzą, że Doktorant opanował te wymagania w stopniu bardzo dobrym. Przedstawione w poszczególnych pracach wyniki (a jest ich sporo) oraz ich dyskusja potwierdzają dojrzałość Autora poprzez prezentację właściwej i równocześnie krytycznej oceny otrzymanych wyników. Należy także w tym miejscu podkreślić ogromny nakład pracy, konieczny do osiągnięcia wytyczonego przez Promotora i Doktoranta celu.

Jednym z nałożonych na recenzenta obowiązków jest zwrócenie uwagi na pewne nieścisłości, które dostrzeżone zostaną w tekście pracy, a które warto poddać dyskusji. W pracy pojawiło się kilka takich niedociągnięć. Dotyczą one szczególnie modelowania farmakokinetyki leków ulegających wzajemnej konwersji w organizmie. Z kolei strona redakcyjna pracy jest wykonana bardzo starannie, z obowiązku znalazłem kilka potknięć i sformułowań wartych w mojej ocenie drobnej korekty. Są one wymienione poniżej:

1. Str. 31. „średni czas transdukcji sygnału” powinno być „średni czas transdukcji sygnału dla pojedynczego kompartmentu”. W mojej ocenie nie ma również konieczności utożsamiania poszczególnych kompartmentów z przekaźnikami.
2. Zamiast „Metotreksat powoduje uszkodzenie wątroby oraz płuc” powinno być zwiększa ryzyko uszkodzenie wątroby oraz płuc. Podobnie zamiast „Leflunomid jest hepatotoksyczny” powinno być że „może mieć działanie hepatotoksyczne”. Te leki nie

u wszystkich osób i nie we wszystkich dawkach wykazują wymienione działania toksyczne.

3. Camp prawdopodobnie oznacza cAMP
4. Str. 32. Z1 jest zmienną pomocniczą. Nie jest ona fikcyjna!
5. Str. 36. Fragment „Tak zdefiniowany model (...) >50%” opisuje wyniki autora i powinien być umieszczony w rozdziale opisującym wyniki.
6. Str. 37. Zamiast „była pompowana z szybkością” powinno być „szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła”
7. Str. 44. powinno być „biologiczny okres półtrwania”
8. Str. 47. Nie jest dla mnie czytelne dlaczego „wartości niektórych parametrów farmakokinetycznych zostały ustalone”. W jaki sposób wybrano te, które nie były szacowane?
9. Str. 47. Zamiast „podjęto próbę przeprowadzenia symulacji” powinno być „przeprowadzono symulacje”.
10. Str. 49 i 50. Przyjęta metodologia nie upoważnia do stwierdzenia, że GRMS-55 nie wykazał działania w teście hamowania TNF- $\alpha$  oraz, że podanie LSF nie wpływa na aktywność aminotransferaz. Można jedynie powiedzieć, że nie udało się pokazać wpływu tych związków.
11. Str. 60. „cAMP może być wykorzystany jako marker odpowiedzi farmakologicznej (...) gdyż cechuje się niewielką zmiennością, łatwością oznaczania (...)”. Nie jest jasne jaką zmienność autor ma na myśli.
12. Str. 60. „charakteryzują się korzystnym profilem hamowania”, „obydwa badane związki charakteryzowały się korzystnymi profilami PK”. Nie jest jasne znaczenie słowa korzystny.
13. Publikacja B. „Thus it seems that after p.o. dosing the rates of elimination of both enantiomers were affected by the absorption process from the GI tract”. Proces eliminacji i proces wchłaniania leku są procesami niezależnymi! Trudno sobie wyobrazić wpływ procesu wchłaniania na szybkość procesu eliminacji.
14. Publikacja C. Parametry PK/PD nie są szacowane poprzez rozwiązanie równań różniczkowych, jedynie w oparciu o pewien model.
15. Publikacja C. Precyzja oszacowania  $I_{max}$  w tabeli 1 sugeruje, że wartości  $I_{max}$  mogą przekraczać 100%. A jest to niemożliwe.



Wymienione wyżej uwagi i pytania nie obniżają pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej autorstwa mgr. Artura Świerczka. Moim zdaniem oceniana rozprawa, pomimo kilku niedociągnięć, jest wartościowa z poznawczego i praktycznego punktu widzenia. Potwierdza również bardzo dobre przygotowanie mgr. Artura Świerczka do prowadzenia badań naukowych. Świadczy o tym również sześć prac naukowych opublikowanych z udziałem Doktoranta, które nie są bezpośrednio związane z tematyką pracy doktorskiej.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja w pełni odpowiada warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum o dopuszczenie mgr. Artura Świerczka do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Gdańsk, 24.02.2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Jan Wier", is located below the date.