



Dr hab. n. med. Magdalena Sowa-Kućma, prof. UR  
Zakład Fizjologii Człowieka  
Kolegium Nauk Medycznych  
Uniwersytet Rzeszowski  
Al. Kopisto 2a, 35-959 Rzeszów  
Tel. 17 8516885, e-mail: msowa@ur.edu.pl

*Rzeszów, dnia 21-04-2020 r.*

## **OCENA**

rozprawy doktorskiej mgr farm. Natalii Malikowskiej-Racia

pt.: „**Poszukiwanie nowych możliwości farmakoterapii zespołu stresu pourazowego**”

wykonanej pod kierunkiem Promotora Pani Prof. dr hab. Kingi Sałat

w Katedrze Farmakodynamiki

Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.

Przedłożona do oceny rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych dotyczy bardzo istotnego klinicznie problemu - farmakoterapii zespołu stresu pourazowego (ang. *posttraumatic stress disorder*, PTSD). PTSD to termin odnoszący się do szerokiego spektrum objawów psychologicznych, jakie mogą rozwinąć się u osób, które doświadczyły lub były świadkami traumatycznych wydarzeń (np. działania wojenne, atak terrorystyczny, gwałt, uprowadzenie, przemoc psychiczna itp.). Nawracające przykre wspomnienia zdarzenia, uczucie oddalenia i wyobcowania, nadmierna reaktywność na bodźce to tylko nieliczne z typowych objawów PTSD. Osoby cierpiące na zespół stresu pourazowego często doświadczają równocześnie innych zaburzeń takich jak: depresja, lęk napadowy, czy nadużywanie i uzależnienie od substancji psychoaktywnych. Wszystko to w istotny sposób wpływa na funkcjonowanie jednostki w społeczeństwie. Stąd bardzo ważna jest wczesna diagnoza PTSD oraz interwencja terapeutyczna, które mogą zredukować intensywność objawów i poprawić jakość życia chorego. Obecnie terapia PTSD polega na łącznym stosowaniu psycho- i farmakoterapii, przy czym ta ostatnia bazuje przede wszystkim na lekach przeciwdepresyjnych, których skuteczność ocenia się na 30% lub nawet mniej. W

związku z tym konieczne jest poszukiwanie nowych form leczenia PTSD a przede wszystkim nowych leków, które będą hamowały jego rozwój. Na ten właśnie cel ukierunkowane były badania Pani mgr Natalii Malikowskiej-Racia.

Podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego, pod kierunkiem doświadczonego Promotora, uważam za niezwykle istotne z punktu widzenia nauk farmaceutycznych i medycznych oraz w pełni uzasadnione. Recenzowana rozprawa została doskonale osadzona w problematyce badań prowadzonych w Katedrze Farmakodynamiki, która jest wyróżniającą się jednostką naukową w kraju w obszarze poszukiwań nowych możliwości farmakoterapii zaburzeń neuropsychiatrycznych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Malikowskiej-Racia została zredagowana i wydana w formie opracowanego opracowania liczącego łącznie 192 strony. Pierwsza jego część, licząca 121 stron, stanowi opracowanie monograficzne w języku polskim dotyczące podjętej tematyki badawczej. W drugiej części zamieszczono dotychczasowy dorobek publikacyjny Doktorantki liczący 13 artykułów opublikowanych w wysoko punktowanych czasopismach naukowych oraz kopie 4 manuskryptów, w których opublikowano część wyników będących przedmiotem recenzowanej pracy. Monografia posiada typowy dla prac oryginalnych układ edytorski: spis treści, wstęp (17 stron), hipotezy badawcze i cele pracy (3 strony), materiały i metody badawcze (10 stron), wyniki (35 stron), dyskusja (21 stron), wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografię. Dopełnieniem tego jest wykaz skrótów, spis tabel oraz rycin. Praca zawiera 1 tabelę oraz 18 rycin, zaś bibliografia obejmuje imponującą liczbę, bowiem aż 305 ponumerowanych pozycji literatury anglojęzycznej.

Rozprawa doktorska napisana jest w zwartym i syntetycznym stylu. Otwiera ją wstęp, podzielony na 4 podrozdziały, które w sposób wyczerpujący wprowadzają czytelnika w podjętą tematykę badawczą. W pierwszym podrozdziale Doktorantka dokonała charakterystyki zespołu stresu pourazowego jako jednostki chorobowej ze szczegółowym omówieniem kryteriów rozpoznania oraz towarzyszących mu neuropatologii. Podsumowaniem tego są dane epidemiologiczne oraz informacje na temat czynników predysponujących do rozwoju PTSD. Moim zdaniem układ tego podrozdziału byłby czytelniejszy, a treść łatwiejsza w odbiorze gdyby dane epidemiologiczne oraz czynniki ryzyka wyprzedzały omówienie neuropatologii związanych z PTSD. W drugim podrozdziale Doktorantka w sposób bardzo obiektywny dokonuje przeglądu skuteczności i tolerancji

aktualnie stosowanego leczenia farmakologicznego osób z PTSD. Kolejne dwa podrozdziały dotyczą zwierzęcych modeli stresu pourazowego. W tym miejscu należy podkreślić dojrzałość naukową Doktorantki, o której świadczy świadomość ograniczeń związanych z modelowaniem klinicznych zaburzeń PTSD u gryzoni. Doktorantka w sposób krytyczny odnosi się do opisywanych w literaturze naukowej modeli PTSD, uwzględniając uwarunkowania psychofizyczne gatunku i tym samym możliwości modelowania konkretnych objawów. Do realizacji celów pracy wybiera ostatecznie jeden z nich - model pojedynczego przedłużonego stresu (ang. *single prolonged stress*; mysia modyfikacja- mSPS), który jest kompilacją kilku innych modeli i najlepiej spełnia pięć istotnych kryteriów zwierzęcego modelu PTSD.

Kolejny rozdział, to sformułowanie celów pracy, które zostały przedstawione w przejrzysty sposób w kilku punktach. Co istotne, poprzedza je prezentacja i dyskusja hipotez badawczych w świetle zaprezentowanych we wstępie informacji, która świadczy również o dużej wiedzy Doktorantki z zakresu neurofarmakologii. Cele są dobrze umotywowane i jednocześnie wskazują na wnikliwe przeanalizowanie i zaplanowanie eksperymentów jako całościowego badania, które ma przynieść odpowiedzi na postawione problemy badawcze. Dobór modelu badawczego został przeprowadzony w sposób prawidłowy. W badaniach wykorzystano myszy szczepu CD-1 obojga płci. Na przeprowadzenie wszystkich doświadczeń uzyskano uprzednio zgodę właściwej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. W pracy dokonano oceny aktywności łącznie 13 związków (w tym jednego w 3 różnych dawkach) o różnych mechanizmach działania. Szczegółowo uzasadniono dobór stosowanych dawek oraz wskazano drogi podania związków. Dla zwiększenia przejrzystości podrozdziału 3.2, zaprezentowane w nim informacje mogły być zbiorczo podane w formie tabeli. W tej części pracy zabrakło również uzasadnienia zastosowania 3 różnych rozpuszczalników (woda, sól fizjologiczna, 1% roztwór Tween 80) dla badanych leków. W kolejnym podrozdziale dotyczącym badań przeprowadzonych na zwierzętach, nie uzasadniono wykorzystania w badaniach pięciu różnych schematów badawczych. Brak jest również szczegółowych informacji na ten temat w rozdziale prezentującym wyniki oraz ich dyskusję. Nazwy podrozdziału 3.3 i 3.4, tj. „Badania *in vivo*” oraz „Badania *in vitro*” w mojej ocenie zostały nieco niefortunnie zastosowane. Bardziej zasadne wydają mi się nazwy, odpowiednio: „Badania behawioralne” oraz „Badania biochemiczne”, bowiem odzwierciedlają lepiej specyfikę przeprowadzonych badań. Na pochwałę zasługuje natomiast opis wykonania modelu PTSD oraz testów behawioralnych służących do oceny aktywności

badanych związków. Zastanawia jedynie fakt, dlaczego Doktorantka w tym miejscu nie zamieściła anglojęzycznych nazw poszczególnych procedur i nie wprowadziła w tekście adekwatnych skrótów, którymi intensywnie operuje w rozdziale dotyczącym prezentacji wyników. Owszem skróty te pojawiają się wcześniej w opisie Ryc. 4, jednak w mojej opinii winny być również zdefiniowane w tekście. W opisie badań biochemicznych Doktorantka zapomniała o bardzo istotnej informacji dotyczącej czasu, w którym została przeprowadzona dekapitacja zwierząt oraz pobranie krwi. Jest to istotne chociażby ze względu na fakt, iż wydzielanie kortykosteronu wykazuje rytmikę okołodobową.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione w uporządkowany i wyczerpujący sposób, zarówno w formie opisowej jak i graficznej. Pomimo bardzo dużej ilości danych i analiz, Doktorantce udało się uniknąć chaosu informacyjnego. Wyniki zostały zaprezentowane w postaci przemyślanych i czytelnych rycin. Większość rycin zawiera staranny opis, z uwzględnieniem typu analizy statystycznej oraz wielkości grup, dzięki czemu czytelnik może sprawnie poruszać się po sekcji z wynikami. Na Ryc. 8 zabrakło mi tytułów wykresów, co zdecydowanie ułatwiłoby interpretację wyników. W opisie tej samej ryciny nieco mylące wydaje się oznaczenie N. i N+, według mnie odpowiednie byłyby N(-) oraz N(+), co jest zgodne z legendą na panelu z wykresami. W tytule Ryc. 9, zamiast skrótu USV, winna być pełna nazwa, czyli: mysich wokalizacji ultradźwiękowych. Na rycinach 12, 13 i 15 przedstawiono uśrednione wyniki uzyskane w testach FC oraz FST w dwóch punktach czasowych, niestety w rozdziale wyniki nie znajdziemy odpowiedzi dlaczego Autorka dokonała takiego zabiegu. Informacja na ten temat pojawia się dopiero w dyskusji. Na podkreślenie zasługuje natomiast organizacja poszczególnych podrozdziałów w sekcji z wynikami. Na wstępie znajdziemy stosowane informacje na temat wykorzystania danego związku w badaniach oraz jego charakterystykę farmakologiczną, co znacznie ułatwia zrozumienie przyjętej przez Doktorantkę koncepcji badań. Sekcja ta wskazuje również na fakt, że Doktorantka swobodnie posługuje się licznymi metodami behawioralnymi, które częściowo wzbogaciła analizami biochemicznymi. Lektura przedłożonej pracy wskazuje także na wnikliwą analizę i bardzo dobrą znajomość narzędzi statystycznych. Doktorantka z niezwykłą ostrożnością „dobierała” odpowiednie testy do konkretnych analiz i wyników, z uwzględnieniem różnych czynników, które mogły mieć wpływ na ostateczny wynik danego eksperymentu. Niewątpliwie wymaga to ogromnej wiedzy merytorycznej, biegłości metodycznej oraz świadomości naukowej. Przeprowadzone badania wykazały, że procedura mSPS indukuje u myszy objawy podobne do depresji oraz zachowań lękowych u ludzi.

Ponadto u tych samych zwierząt obserwowano zwiększoną liczbę wokalizacji ultradźwiękowych oraz wzrost ekspresji warunkowej reakcji strachu. Podania: wenlafaksyny, bupropionu, ketaminy, tiagabiny, pramipeksolu, rotigotyny oraz związku LY341495 indukowały efekt przeciwdepresyjny w teście wymuszonego pływania u myszy poddanych procedurze mSPS. Ponadto w tym samym modelu wykazano aktywność przeciwłękową: tiagabiny, buspironu oraz związków LY354740 i LY341495. Podania czterech z badanych związków skracaly również czas trwania reakcji zamierania teście warunkowania strachu. Pozostałe związki, tj. klonidyna, dihydrekzydyna i bromokryptyna nie wykazały istotnej aktywności w mysim modelu PTSD, zaś zaobserwowana aktywność modafinilu mogła być wynikiem fałszywie pozytywnym, wynikającym z agitacji psychomotorycznej wywołanej przewlekłym podaniem tego leku.

Obszerna dyskusja wyników jest ciekawie poprowadzona oraz przedstawiona w sposób przejrzysty, dzięki organizacji w 6 logicznych podrozdziałów. Napisana jest w sposób rzeczowy i wnikliwy. Czyta się ją wartko, nie jest nudna i pełna interesujących pomysłów na interpretację wyników. Co ważne, Doktorantka dyskutuje własne wyniki w odniesieniu zarówno do publikowanych danych przedklinicznych jak i klinicznych. Świadczy ona o doskonałym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki i jest mocną stroną przedłożonej pracy. Dyskusję czyta się z dużym zainteresowaniem, dowodzi ona znajomości rozległego piśmiennictwa oraz umiejętności jego wykorzystania do interpretacji wyników. Na str. 81 zabrakło mi jedynie dyskusji prawdopodobnej przyczyny braku efektu płci w przeprowadzonych badaniach. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano poprawnie 13 wniosków końcowych, które są logiczne i bezpośrednio wynikają z przeprowadzonych doświadczeń.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić również uwagę na kilka niedociągnięć edytorskich, które dostrzegłam podczas lektury przedłożonej rozprawy:

1. W wykazie skrótów brak jest istotnych skrótów, które odnoszą się do nazw testów behawioralnych (np. FST, EPM, FC, czy USV), które znalazły częste zastosowanie w pracy.
2. W mojej ocenie, w wykazie skrótów pełne nazwy polskojęzyczne winny poprzedzać nazwy anglojęzyczne. Ponadto, z niewiadomych przyczyn, przy części skrótów Doktorantka zamieszcza nazwy anglojęzyczne, przy pozostałych nie, pomimo, iż skrót

związany jest z anglojęzycznym brzmieniem (np. GR - glucocorticoid receptor, czy HVA - Homovanillic acid).

3. Na stronach 14-16 omówione zostały kryteria rozpoznania PTSD. Przedłożona monografia jest napisana w języku polskim, stąd poszczególne kryteria winny być w języku polskim a ich anglojęzyczne odpowiedniki w nawiasach.
4. Legenda do Ryc. 1 winna zostać wzbogacona o objaśnienia strzałek i znaków graficznych obrazujących hamowanie, co zwiększyłoby czytelność grafiki.
5. W pracy zdarzają się błędy literowe, nieprawidłowa odmiana wyrazów, braki interpunkcyjne, czy inne potknięcia językowe, np.
  - a. Str. 21- „rozwój cech powodowanych modelem” – poprawniejsze brzmienie: rozwój cech indukowanych modelem
  - b. Str. 23 – „Amerykańska Agencja do Spraw Żywności i Leków zarejestrowała jedynie dwa leki z tej grupy: sertralinę i paroksetynę” – Autorka zastosowała zbyt duży skrót myślowy. Należało dodać, że do leczenia PTSD.
  - c. Str. 23 – „oraz przedstawiciela kolejnej grupy leków przeciwdepresyjnych” – należało napisać, której konkretnie.
  - d. Str. 24 – użyto „te” zamiast to; str. 28, 63 – „funkcji PPN” zamiast funkcji osi PPN; „fenomologiczny” zamiast fenomenologiczny; str. 54 – „busprionu” zamiast bupropionu; często w pracy pojawiają się zwroty: „w teście FPT/FST” winno być w FPT (ang. *four-plate test*) lub w FST (ang. *forced swim test*) itp.
  - e. Nie doszukałam się rozdziału 0, na który powołuje się Autorka na str. 28
  - f. Str. 54 - co Autorka ma na myśli pisząc: niezależnie od stopnia rozwoju modelu”?

Podsumowując, wybór tematu pracy doktorskiej uważam za trafny i zgodny z kierunkiem współczesnych badań naukowych i aktualnym stanem wiedzy. Doktorantka wybrała bardzo interesujący temat badań, który dobrze wpisuje się w światowe trendy badań w dziedzinie neurofarmakologii. Przetawiony wstęp, prezentacja wyników oraz ich dyskusja i końcowe wnioski wskazują na doskonale przygotowanie merytoryczne i metodologiczne Doktorantki oraz bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu. Użyte metody są adekwatne do celu pracy. Otrzymane wyniki są oryginalne, zostały omówione i przedstawione z należyłą starannością. Sformułowane wnioski nie budzą żadnych zastrzeżeń. Przedstawione badania są nowatorskie i mają duże znaczenia poznawcze, również dla

klincystów. Uwagi przedstawione w recenzji w żaden sposób nie umniejszają mojej wysokiej oceny tej pracy. O wysokiej wartości naukowej przeprowadzonych przez Doktorantkę badań świadczy również fakt, iż większość zaprezentowanych wyników została już opublikowana w 3 czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania (2.77-5.57), których dopełnieniem jest interesująca praca przeglądowa.

Praca doktorska pt.: "Poszukiwanie nowych możliwości farmakoterapii zespołu stresu pourazowego" w pełni spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr Natalii Malikowskiej-Racia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto uważam, że przedłożona praca oraz dorobek naukowy mgr Natalii Malikowskiej-Racia spełniają odpowiednie wymogi regulaminowe Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, dlatego w załączeniu składam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



Dr hab. n. med. Magdalena Sowa-Kućma, prof. UR