Lublin, 16.08.2022

Samodzielna Pracownia Analiz Izobolograficznych

Instytut Medycyny Wsi,

ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin

Dr hab. n. med. Marta Andres-Mach

Recenzja pracy doktorskiej mgr farm. Anny Furgały-Wojas
„Wybrane terapie eksperymentalne w zapobieganiu i zwalczaniu bólu neuropatycznego wywołanego oksaliplatyną"

Podstawa formalna opracowania recenzji

Niniejsza recenzja została sporządzona w odpowiedzi na pismo Prodziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM ds. nauki i rozwoju prof. dr hab. Marcina Kołaczkowskiego oraz Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki farmaceutyczne UJ prof. dr hab. Anny Wesołowskiej z dnia 30.06.2022 r.

Rozprawa doktorska pt „Wybrane terapie eksperymentalne w zapobieganiu i zwalczaniu bólu neuropatycznego wywołanego oksaliplatyną" autorstwa mgr farm. Anny Furgały-Wojas została przygotowana pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Kingi Sałat z Katedry Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego CM UJ.

Badania przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej zrealizowano w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki pt. „Opracowanie metody optymalizacji dawkowania leków przeciwbólowych stosowanych jako terapia skojarzona bólu neuropatycznego z wykorzystaniem metod sztucznej inteligencji" (numer: UMO-2015/17/B/NZ7/02937, którego kierownikiem jest promotor rozprawy prof. dr hab. Kinga Sałat).

Tematyka rozprawy

Bol neuropatyczny jest jednym z rodzajów bólu przewlekłego, trwającego co najmniej 3 miesiące, który indukowany jest poprzez pierwotne uszkodzenie lub dysfunkcję części ośrodkowego układu nerwowego: mózgu, rdzenia kręgowego czy pojedynczych nerwów budujących obwodowy układ nerwowy. Neuropatia obwodowa indukowana chemioterapią (ang. *chemotherapy-induced peripheral neuropathy*, CIPN) to najczęstsze neurologiczne powikłanie chemioterapii doustnej lub dożylnej stosowanej w terapii onkologicznej. Substancjami najczęściej indukującymi to powikłanie są pochodne platyny, taksoidy, alkaloidy barwinka, bortezomib, cytarabina, interferon czy też talidomid. Niestety na dzień dzisiejszy chemioterapia stanowi jedną z najważniejszych farmakologicznych (systemowych) metod leczenia przeciwnowotworowego (rak piersi, płuc, szyjki macicy, prostaty, jajnika, jąder, przewodu pokarmowego oraz krwi lub szpiku kostnego). Pojawienie się CIPN bardzo często wpływa ograniczająco na dawkę chemioterapeutyku, co oznacza, że może skutkować przerwami w dawkowaniu, subterapeutycznym dawkowaniem a nawet przerwaniem terapii, co z kolei może mieć wpływ na progresję nowotworu. Ostre objawy CIPN mogą pojawić się już nawet w ciągu kliku ciągu godzin po infuzji, natomiast utrzymujące się objawy występują u około 70% pacjentów miesiąc po zakończeniu chemioterapii i 30% pacjentów kilka miesięcy później. Pacjenci z CIPN wymagają dodatkowo nawet kilkunastu wizyt ambulatoryjnych więcej, wydłużonych pobytów w szpitalu a tym samym więcej wydatków związanych z terapią niż pacjenci bez CIPN. W ten sposób CIPN może poważnie zaszkodzić fizycznym, społecznym, emocjonalnym, funkcjonalnym, finansowym i zawodowym aspektom życia. Dlatego niezmiernie ważny w terapii przeciwnowtworowej jest odpowiedni dobór leków redukujących/uśmierzających CIPN, co na ten moment jest ogromnym wyzwaniem dla medycyny.

Doktorantka w swojej pracy szczegółowo opisała problematykę związaną z odpowiednim dobraniem leku w CIPN, zwracając uwagę na fakt, iż obecne rekomendacje dotyczą wyłącznie ogólnego leczenia bólu neuropatycznego bez różnicowania dolegliwości w zależności od mechanizmu uszkodzenia. Na chwilę obecną w terapii CIPN wykorzystuje się kilka grup farmakologicznych: inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI np. duloksetyna, wenlafaksyna), preparaty działające miejscowo (maści/plastry z lidokainą, kapsaicyną), leki przeciwpadaczkowe (np gabapentyna i pregabalina), trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (np.,

amitryptylina, nortrypltylina), leki opioidowe (łagodne np. tramadol czy silne opioidy jak morfina, oksykodon, metadon), toksyna botulinowa typu A.

Z uwagi na fakt, iż na dzień dzisiejszy brakuje skutecznego leczenia w pełni łagodzącego objawy bólu neuropatycznego, jak najbardziej pożądane są badania w kierunku znalezienia i opracowania skutecznej profilaktyki uszkodzeń CIPN. W tym celu naukowcy poszukują, syntetyzują i oceniają potencjalne działanie terapeutyczne nowych kandydatów na leki przeciwko CIPN, jak również wykorzystują dostępne już na rynku farmaceutycznym leki i sprawdzają ich działanie przeciwbólowe poza zakresem wskazań rejestracyjnych.

Głównym założeniem przedstawionej mi do recenzji dysertacji była ocena wpływu wybranych 13 leków już zarejestrowanych do leczenia innych niż ból neuropatyczny schorzeń i ich połączeń na próg pobudliwości bólowej u myszy. Do badań wykorzystany został model CIPN indukowanej oksaliplatyną.

Niniejsza rozprawa doktorska ma podział klasyczny, zawiera 210 stron maszynopisu, w tym 51 rycin, 4 tabele oraz 22 strony bibliografii ułożonej według kolejności cytowania. Rozprawę rozpoczyna spis treści, następnie wykaz skrótów stosowanych w pracy, spis tabel i rycin, wstęp, hipoteza i cele badawcze, materiały i metody badawcze, wyniki, dyskusja, wnioski, spis publikacji objętych rozprawą doktorską, streszczenie w języku polskim i angielskim, bibliografia oraz wykaz publikacji doktoranta.

Tekst jest napisany poprawną polszczyzną i bardzo starannie edytowany, z pojedynczymi niezręcznościami stylistycznymi, literówkami czy błędami gramatycznymi m.in.:

a) str. 29 – zamiast *padania* cytostatyków powinno być *podania* cytostatyków

b) str. 45 nieprawidłowy szyk zdania- zamiast *W zależności od drogi podania pomiar po związku wykonywany był po 30 minutach* powinno być *W zależności od drogi podania związku pomiar wykonywany był po 30 minutach*

c) str. 55, 159 – zamiast *najoptymalniejsze* powinno być *optymalne* - nie stopniuje się przymiotnika optymalny

d) str. 78 – zamiast otrzymały powinno być otrzymała

e) str. 126, 162 – nieprawidłowa odmiana nazw leków (zamiast ceftriaksonu aripiprazolu, ambroksolu powinno być ceftriakson aripiprazol ambroksol)

f) str. 173 – zamiast *wynikać z pobudzenie* powinno być *wynikać z pobudzenia*

We *Wstępie* (rozdział 1) Doktorantka w zwięzły sposób przedstawiła najistotniejsze informacje dotyczące bólu neuropatycznego z wyodrębnieniem neuropatii obwodowej indukowanej chemioterapią uwzględniając definicję tego schorzenia, mechanizmy uszkodzenia indukujące CIPN oraz dostępne możliwości leczenia bólu neuropatycznego. Ostatni podrozdział dedykowany jest poszukiwaniom nowych potencjalnych kandydatów na leki przeciwko CIPN. Z uwagi na rodzaj badań ujętych w prezentowanej pracy (badania z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych) należało we wstępie uwzględnić również podrozdział opisujący obecnie wykorzystywane zwierzęce modele bólu neuropatycznego oraz uzasadnić swój wybór modelu CIPN indukowanego oksaliplatyną. Jest to dość istotny element wprowadzający w tematykę badawczą prezentowanej przez Doktorantkę pracy, którego w tym rozdziale brakuje.

W rozdziale 2 *Hipoteza i cele badawcze* Autorka przedstawiła główny cel badań a mianowicie określenie wpływu wybranych leków i ich połączeń na próg pobudliwości bólowej w mysim modelu CIPN indukowanej oksaliplatyną oraz wymienia cele szczegółowe oceniające działanie leków w zależności od mechanizmów uszkodzenia wywołujących CIPN. Nie uwzględniono jednak hipotezy badawczej w oparciu o którą doktorantka zaplanowała wyżej wymienione cele. Dodatkowo Doktorantka w tym rozdziale opisała mechanizm uszkodzenia i indukcji bólu neuroptycznego przez oksaliplatynę, co moim zdaniem należało zamieścić we wstępie na przykład w dodatkowym rozdziale poświęconym zwierzęcym modelom CIPN.

W rozdziale 3 *Materiały i Metody badawcze* Doktorantka szczegółowo opisała metodykę badań i wykorzystane do doświadczeń materiały (zwierzęta, badane związki, opis 8 schematów badawczych podawania leków oraz wykonanych testów behawioralnych). Rozdział kończy opis wykorzystanych testów statystycznych do analizy uzyskanych wyników. Badania zostały przeprowadzone po uzyskaniu zgody II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (4/2016) oraz I Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (245/2019). Z uwagi na bardzo dużą ilość schematów badawczych zaplanowanych przez Doktorantkę niezwykle przydatne są ryciny prezentujące sposób podania związków.

W rozdziale 3.2. Badane związki Autorka wymienia i opisuje dawki i drogi podania leków wybranych do badań. Wszystkie leki za wyjątkiem simwastatyny morfiny i cebranopadolu zostały podane dootrzewnowo. Ambroksol jako jedyny lek podany był dożylnie w dawkach 37.5 mg/kg oraz 12.5 mg/kg a następnie w celu dostosowania dawki do podania dootrzewnowego Doktorantka podała również ten lek w dawkach 90 mg/kg oraz 150 mg/kg. Proszę o wyjaśnienie dlaczego dla trzech wyżej wymienionych leków (simwastatyna morfina i cebranopadol) nie dostosowano dawki do podania dootrzewnowego (nie wyznaczono eksperymentalnie w warunkach laboratoryjnych) tak jak to zrobiono w przypadku ambroksolu?

Opis modelu CIPN indukowanego oksaliplatyną (*3.4.1.1 Indukcja neuropatii obwodowej za pomocą oksaliplatyny*) należało umieścić oddzielnie przed schematami badawczymi a nie w podrozdziale *Wykonane testy behawioralne* gdyż sama indukcja CIPN nie jest testem behawioralnym.

Rozdział 4 *Wyniki* stanowi jedną z kluczowych części dla całej rozprawy. Należy podkreślić, że Doktorantka przebadała bardzo dużą ilość związków i ich kombinacji a poza szczegółowym opisem danych uzyskanych dla wybranych leków i ich połączeń przedstawiła rezultaty swoich badań na 38 rycinach.

Uzyskane wyniki wykazały, że duloksetyna (30 mg/kg), pregabalina (30 mg/kg), amitryptylina (2.5 i 10 mg/kg), cebranopadol (10 mg/kg), lakozamid (30 mg/kg) oraz ambroksol (37.5 mg/kg, i.v.) łagodzą objawy nadwrażliwości termicznej i ujawniają działanie przeciwbólowe w teście zimnej płytki. Dla niektórych z badanych leków wykazano efekt hamujący rozwój nadwrażliwości po siedmiu dniach od podania oksaliplatyny. Podobnie, w teście zimnej płytki uzyskano istotne statystycznie wyhamowanie nadwrażliwości dla wielokrotnie podanej: duloksetyny (30 mg/kg), bromheksyny (150 mg/kg), simwastatyny (100 mg/kg) oraz minocykliny (100 mg/kg), natomiast w teście von Freya taką aktywność wykazano dla: duloksetyny (10 i 30 mg/kg) po podaniu jednorazowym i wielokrotnym, jak również dla wielokrotnie podanego ambroksolu (90 i 150 mg/kg), bromheksyny (90 i 150 mg/kg), ceftriaksonu (200 mg/kg) oraz minocykliny (50 i 100 mg/kg).

Na ogromne uznanie zasługuje fakt, że uzyskane wyniki w zdecydowanej większości zostały już opublikowane w 8 artykułach o zasięgu międzynarodowym, w 3 pracach Doktorantka jest pierwszym a w 4 artykułach drugim autorem (Rozdział 7 *Spis publikacji objętych pracą doktorską*).

Zdumiewające zatem jest, że Doktorantka nie zdecydowała się na przygotowanie rozprawy doktorskiej w oparciu o publikacje. Zebranie tak ogromnej ilości materiału w jedną pracę stanowi ogromne wyzwanie, gdyż ciężko uniknąć wprowadzenia zbyt dużego natłoku przekazywanych informacji. Analiza wyników w oparciu o publikacje zdecydowanie ułatwia ich przyswojenie, i zrozumienie.

Rozdział 5 *Dyskusja* to kolejny bardzo istotny element niniejszej dysertacji. Podzielony został na 9 podrozdziałów, w każdym z nich Doktorantka kolejno omówiła uzyskane wyniki i bazując na swoich danych przeprowadziła dyskusję przywołując wyniki uzyskane przez innych badaczy. Podział dyskusji na podrozdziały poniekąd wymusił na Doktorantce przygotowanie wprowadzenia do każdego z nich, stąd też przykuwa uwagę zbyt duża ilość informacji ogólnych dotyczących na przykład badanych związków (opioidy, simwastatyna, ambroksol, bromheksyna itd) czy też sprzętu wykorzystanego do pomiaru preferencji temperaturowych zwierząt (str. 174). Opis właściwości badanych substancji, ich mechanizmu działania czy tez zastosowania terapeutycznego należało zamieścić we wstępnie a nie w dyskusji, gdyż ten rozdział ma na celu przede wszystkim zestawienie swoich danych z danymi innych eksperymentatorów oraz prezentację ewentualnych uzasadnień dotyczących własnych wyników. Dyskusję kończy podrozdział 5.9. *Ograniczenia przeprowadzonych badań,* w którym Doktorantka podsumowała swoją pracę doktorską podkreślając przy tym, że: *otrzymane wyniki są rezultatem badań na zwierzętach, co niesie pewne ograniczenia w przypadku chęci ich translacji na ludzi (str. 176).* Z kolei w rozdziale 2. *Hipoteza i cele badawcze* Autorka napisała, że: *Zaletą wykorzystania leków powszechnie dostępnych jest z pewnością to, że leki te są dobrze poznane w kontekście ich działania farmakologicznego, w tym działań niepożądanych, a sam proces ewentualnego wprowadzenia ich do terapii bólu neuropatycznego byłby zdecydowanie skrócony (str 41).* W związku z tym, że jednym z założeń niniejszej pracy było wykorzystanie do badania związków już komercyjnie dostępnych i stosowanych w lecznictwie proszę o ustosunkowanie się do tego twierdzenia i wyjaśnienie czy rzeczywiście nie jest możliwe wykorzystanie niektórych kombinacji leków w leczeniu neuropatii u ludzi. Z prezentowanej przez Doktorantkę pracy wynika że np. połączenie pregabaliny z lakozamidem (a więc dwóch leków stosowanych w lecznictwie) daje silny efekt przeciwbólowy w teście von Freya.

Opierając się na zebranych wynikach Doktorantka wysunęła 18 wniosków, które zebrała i opisała w rozdziale 6. Sposób sformułowania wniosku 2 jest zbyt ogólny (cytat str 178: *Duloksetyna (10 i 30 mg/kg i.p.) wykazała istotny wpływ na objawy CIPN, w szczególności w schemacie podania profilaktycznego*) – należy doprecyzować jaki wpływ miała duloksetyna.

Powyższe sugestie i uwagi dotyczące zarówno brakujących informacji we *Wstępie*, *Hipotezie*, nadmiaru informacji w *Dyskusji*, prawidłowego sformułowania wniosków czy też drobnych błędów stylistycznych nie wpływają na ogólną bardzo wysoką ocenę recenzowanej dysertacji.

Na podstawie lektury rozprawy doktorskiej pt. *Wybrane terapie eksperymentalne w zapobieganiu i zwalczaniu bólu neuropatycznego wywołanego oksaliplatyną* stwierdzam, że mgr farm. Anna Furgała-Wojas wykazała się niezwykle wszechstronną wiedzą teoretyczną w zakresie dyscypliny nauki farmaceutyczne, umiejętnością samodzielnego prowadzenia prac naukowych a przygotowana przez nią rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego przedstawionego we wstępie pracy.

W związku ze spełnieniem warunków formalnych określonych w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku poz. 1789 z późn. zm.) stawiam wniosek o przyjęcie recenzowanej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr farm. Anny Furgały-Wojas do publicznej obrony przed Radą Dyscypliny Nauki farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Dodatkowo, mając na uwadze wysoki poziom badawczy, istotne walory poznawcze pracy oraz innowacyjność narzędzi metod badawczych (opracowanie nowej aparatury eksperymentalnej umożliwiającej ocenę preferencji temperaturowych zwierząt w zależności od zastosowanej temperatury płytek oraz podanych leków) oraz opublikowanie wyników w 8 publikacjach o zasięgu międzynarodowym wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa mgr farm. Anny Furgały-Wojas.

Wniosek o wyróżnienie w załączeniu.

KIEROWNIK
SAMODZIELNEJ PRACOWNI ANALIZOBOLOGRAFICZNYCH
Dr hab. n. med. Marta Andres-Mach
dr hab. n. med. Marta Andres-Mach, prof. IMW

Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki, ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin
tel: 81 71 84 400, fax: 81 74 78 646, e-mail: imw@imw.lublin.pl
www.imw.lublin.pl
KRS: 0000126672, NIP: 712-010-37-81