

Prof. dr hab. n. med. Irena Nalepa
Kierownik Zakładu Biochemii Mózgu
Tel. 12 6623225
e-mail: nalepa@if-pan.krakow.pl

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr AGNIESZKI WAWRZCZAK- BARGIEŁY pt. „Wpływ morfiny na aktywność kinaz ERK w wybranych strukturach mózgu myszy”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska p. mgr Agnieszki Wawrzczak-Bargieły została wykonana pod kierunkiem p. prof. dr hab. n. med. Ryszarda Przewłockiego w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie. Tematyka pracy doskonale wpisuje się w wieloletnie badania promotora i dotyczy ważnej problematyki neurochemicznych i molekularnych zmian w mózgu, które leżą u podłoża uzależnienia – przewlekłej i nawracającej choroby ośrodkowego układu nerwowego. Mechanizm uzależnienia od opioidów jest od wielu lat intensywnie badany ze względu na fakt iż leki opioidowe są szeroko stosowane w terapii bólu przewlekłego, a z drugiej strony są najczęściej nadużywanyimi substancjami uzależniającymi. Należy podkreślić, że pomimo ogromnego postępu wiedzy mechanizm powstawania uzależnień lekowych nie jest wyjaśniony w stopniu wystarczającym do opracowania skutecznej terapii przeciw uzależnieniu od morfiny i innych opioidów. Tym niemniej obecne podejścia badawcze do mechanizmów uzależnienia, a także do innych patologicznych stanów – różnych zaburzeń funkcjonowania mózgu, nakierowane są na badania wewnątrzkomórkowych białek sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za adaptację do działania substancji o potencjale uzależnieniowym i przełączenie funkcji mózgu z fizjologicznego stanu homeostazy do stanu patologicznej allostazy. Oceniana rozprawa doktorska dotyczy więc zagadnienia niezwykle ważnego nie tylko z poznawczego punktu

widzenia ale także potencjalnego praktycznego / medycznego wykorzystania uzyskanych wyników do opracowywania terapii przeciw uzależnieniu.

Rozprawa liczy 146 stron, w tym: streszczenie w języku polskim, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, założenia i cele pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz bibliografia. Rozprawa ma typowy, przejrzysty układ, dopracowaną szatę graficzną i, co warto podkreślić, w całości jest opracowana bardzo starannie. Zawiera 52 ryciny i 10 tabel oraz 230 pozycji piśmiennictwa adekwatnie cytowanego w tekście. Tekst rozprawy został napisany w sposób klarowny, i nie budzi zastrzeżeń pod względem poprawności językowej. 17-Stronicowy rozdział Wstępu wprowadza czytelnika w problematykę rozprawy doktorskiej. Po syntetycznym opisie układu opioidowego, egzogennych substancji opioidowych i komórkowego mechanizmu działania morfiny Doktorantka omawia pojęcie uzależnienia opioidowego i podaje charakterystykę morfiny jako substancji uzależniającej oraz wybrane modele zwierzęce stosowane w badaniach nad uzależnieniem opioidowym. Druga część Wstępu jest poświęcona omówieniu zmian na poziomie molekularnym wywoływanym przez przewlekłe podawanie morfiny, a kolejna omówieniu wewnątrzkomórkowych kaskad sygnałowych MAPK, w tym roli kinaz ERK w układzie nerwowym i w uzależnieniu od opiatów. Wprawdzie istnieją doniesienia o zmianach fosforylacji kinaz ERK w uzależnieniach jednak badania te nie rozróżniały kinazy ERK1 i ERK2 jako oddzielnych enzymów i były one analizowane łącznie jako kinaza ERK1/2. Ta część rozprawy zakończona jest Ryc. 1, przedstawiającą szlaki wewnątrzkomórkowe pobudzane w wyniku działania morfiny na receptor opioidowy μ i prowadzące do fosforylacji kinaz ERK. Wstęp dobrze wprowadza czytelnika w temat i uzasadnia podjęcie zagadnienia badawczego.

Uwagi do Wstępu:

- ✓ Str. 27, Autorka używa skrótu myślowego pisząc że „... Fosfolipaza C bierze udział w aktywacji kinaz PKC i CaMKII ..” ponieważ pomija etap wtórnych przekazników DAG i IP3.
- ✓ Wspomniano o różnicach w funkcji ERK1 i ERK2 ale brak jest konkretnych przykładów – uszczegółowienia jakiego typu są to różnice.

Założenia i cele rozprawy doktorskiej zostały jasno sprecyzowane i zamieszczone jako osobny rozdział. Doktorantka postawiła sobie za zadanie (I) zbadanie regulacji kinaz ERK1 i ERK2 w czterech strukturach mózgu myszy, wybranych ze względu na ich znaczenie w uzależnieniu. Były to: hipokamp, ciało migdałowe, kora czołowa oraz prążkowie. Badania przeprowadzono w trzech modelach działania morfiny: podanie jednorazowe, przewlekłe i warunkowa preferencja miejsca wywołana morfiną. Następnym celem (II) była analiza potencjalnego zróżnicowania udziału ERK1 i ERK2 w działaniu morfiny, którą dokonywano w oparciu o kolejne cele badawcze, takie jak (III) zbadanie fenotypu komórek w których dochodzi do fosforylacji ERK1 i ERK2, (IV) mapowanie aktywacji ERK1/2 w warunkowanej preferencji miejsca morfinowego oraz (V) zbadanie w tym modelu ekspresji genów.

Uwaga do Założeń:

- ✓ Mam tutaj wątpliwość co do poprawności użytego określenia „model fosforylacji kinaz” jako „marker uzależnienia”. W mojej opinii bardziej adekwatnym byłoby określenie „wzór fosforylacji kinaz”. Jednak nawet gdyby użyć takiego określenia to w dalszym ciągu mam pewne wątpliwości co do zasadności rozpatrywania fosforylacji kinaz ERK1 i ERK2 jako markera uzależnienia. Jak wiadomo fosforylacja kinaz może być wywołana wieloma czynnikami i nie jest czymś specyficznym dla uzależnienia.

Rozdział Materiały zawiera opis zwierząt i warunków eksperymentów, ponadto składa się z 5 tabel w których spisano stosowane przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe, zastosowane startery w reakcji qRT-PCR, stosowane roztwory i inne odczynniki. Badania prowadzono na myszach samcach szczepu C5BL/6J. Rozdział Metody został napisany w sposób zwięzły ale wystarczająco dokładny aby wykazać bardzo dobre opanowanie przez Doktorantkę warsztatu metodycznego, począwszy od metod badania zachowania zwierząt do licznych zastosowanych technik biochemicznych, będących wieloetapowymi procedurami, takich jak analiza ekspresji białka metodą Western blot, analiza immunohistochemiczna, analiza stereologiczna, barwienia immunoenzymatyczne i immunofluorescencyjne oraz analiza qRT-PCR ekspresji mRNA genów kodujących różne



białka komórkowe. W tym rozdziale zamieszczono 4 schematy obrazujące dawkowanie, czas podawania morfiny i czas pobierania materiału do badań, który był pozyskiwany w kilku punktach czasowych. Te schematy zdecydowanie ułatwiają czytelnikowi odbiór wyników. Recenzowaną pracę oceniam wysoko pod względem metodycznym.

Uwagi do rozdziału Metody:

- ✓ Na ryc. 3 użyto określenia pochodzącego z żargonu farmakologicznego: „podania przewlekłej morfiny”, to nie morfina jest „przewlekła” a jej podawanie
- ✓ W tym i innych rozdziałach Doktorantka używa określenia „przewlekłe podanie morfiny” podczas gdy powinno się użyć określenia „przewlekłe podawanie..”

Wyniki są najobszerniejszym rozdziałem rozprawy, obejmują 51 stron. Zostały przedstawione na 45 przeważnie złożonych rycinach, z których część stanowią mikrofotografie oraz zostały ujęte w 3 tabelach stanowiących graficzne podsumowanie uzyskanych wyników na poszczególnych etapach realizacji pracy doktorskiej. Zarówno ryciny jak i tabele cechuje przejrzysta konstrukcja, są prawidłowo i wystarczająco szczegółowo opisane. Rozprawa doktorska dostarczyła wiele interesujących wyników. Doktorantka stwierdziła że poziom białek ERK1 i ERK2 oraz ich ufosforylowanych form podlega wyraźnym i wielokierunkowym zmianom pod wpływem morfiny. Już jednorazowe podanie morfiny powoduje wzrost fosforylacji obydwu kinaz, obserwowany do 4 godzin od iniekcji (w prążkowi i ciele migdałowatym), podczas gdy w hipokampie ten efekt pojawia się już po 20 min od podania leku, natomiast nie obserwowano zmian w korze czołowej. Bardziej zróżnicowanym regulacjom podlegają ERK1 i ERK2 w wyniku przewlekłego podawania morfiny. Przy czym wyniki wydają się wskazywać na istotną rolę ERK2 w hipokampie i ciele migdałowatym. Najważniejszym w moim odczuciu osiągnięciem mgr Agnieszki Wawrzczak-Bargieły było stwierdzenie, że w modelu warunkowanej preferencji miejsca (CPP) wywołanej morfiną dochodzi do złożonej regulacji aktywności kinaz ERK1 i ERK2 i co więcej zmiany poziomu kinaz ERK1 i ERK2 korelują z zachowaniem poszukiwawczym zwierząt warunkowanych morfiną w czasie ekspresji CPP. Wszystkie

uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują na istotność roli ERK2 w mechanizmie działania nagradzającego morfiny. W związku z powyższym, ta z dwóch badanych kinaz mogłaby, jak zauważa Doktorantka, być „potencjalnym celem postępowania terapeutycznych w leczeniu zaburzenia wywołanego używaniem opioidów”. Przedstawione wyniki mają nowatorski charakter i wnoszą do nauki istotne wartości.

Pomimo dużej ilości wyników Dyskusja jest zwięzła i dobrze osadzona w uzyskanych danych. Doktorantka umiejętnie interpretuje rezultaty swoich badań w oparciu o adekwatnie dobrane i obszernie piśmiennictwo. Rozprawa została zakończona Podsumowaniem i oraz umiejętnie sformułowanymi wnioskami, wskazującymi wyraźnie iż cele rozprawy zostały osiągnięte.

Do rozdziału Dyskusji mam jednak kilka uwag:

- ✓ W toku dyskusji nie poruszono zagadnienia farmakokinetycznych parametrów morfiny. Mam tutaj na myśli biologiczny okres półtrwania, obecność w mózgu w różnych czasach gdy były pobierane tkanki do badań biochemicznych, szacunkowe stężenia leku w mózgu. Wprawdzie takie badania nie były przedmiotem rozprawy, ale istnieje piśmiennictwo na ten temat. Moje pytanie zmierza do określenia które z zaobserwowanych przez Doktorantkę zmian w fosforylacji kinaz ERK mogły być związane z bezpośrednią obecnością morfiny, a w jakim przedziale czasowym możemy mówić o adaptacyjnym charakterze obserwowanych zmian.
- ✓ Str. 113, linia 15-16 od dołu, konstrukcja zdania niejasna, nie bardzo wiadomo do czego odnosi się fragment „... nie bierze udziału w tolerancji na przeciwbólowe działanie morfiny.”
- ✓ Str. 119, linia 15 od góry, brakuje „w wyniku”
- ✓ Str. 122, uwaga stylistyczna dotycząca ostatniego zdania górnego akapitu które nie jest jasno sformułowane: „... że w stanie uzależnienia może dochodzić do przejścia na poziomie neuronalnym, mechanizmów kontroli...”. Powinno raczej być użyte określenie „przemieszczania się” lub „reorganizacji na poziomie neuronalnym, mechanizmów kontroli i „przekazania” kontroli ...



W podsumowaniu rozprawę doktorską mgr Agnieszki Wawrzczak-Bargieły oceniam pozytywnie. Przeprowadzone doświadczenia zostały starannie zaplanowane i wykonane. Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą i umiejętnością prowadzenia badań naukowych. Rozprawa zawiera interesujące wyniki, które noszą cechy odkryć naukowych.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie o dopuszczenie mgr Agnieszki Wawrzczak-Bargieły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Zakładu Biochemii Mozgu
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Prof. dr hab. Irena Nalepa

Kraków dn. 16.07.2020