



Prof. dr hab. Jolanta Barańska

Warszawa, 23 kwietnia 2020 r.

OCENA

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

wykonanej w Zakładzie Neurofizjologii Molekularnej Instytutu Farmakologii
im. Jerzego Maja, PAN, pod kierunkiem prof. dr hab. Ryszarda Przewłockiego

1. Podstawa formalna opracowania recenzji

Rada Naukowa Instytutu Farmakologii PAN na posiedzeniu w dniu 1 grudnia 2009r. uchwaliła wybór mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej pani mgr Agnieszki Wawrzczak-Bargieły. Rolą recenzenta nie jest wnikanie w przyczynę zwłoki w dostarczeniu powyższej rozprawy, a dokonanie jej oceny jako takiej, co niniejszym czynię.

2. Tematyka rozprawy i uzasadnienie podjęcia tematu

Oceniając rozprawę doktorską pani mgr Agnieszki Wawrzczak-Bargieły stwierdzam, że spełnia ona wszelkie wymogi stawiane przez ustawę pracom tego typu.

Doktorantka w przedstawionej do recenzji pracy zajmuje się problemami uzależnienia organizmu zwierzęcego od substancji narkotycznej – morfiny. Opisuje badania, które prowadziła na wybranych strukturach mózgu, zaangażowanych w powstanie uzależnienia: prążkowiu, ciele migdałowatym, korze czołowej oraz hipokampie. Uznając słusznie, że wy tłumaczenie uzależnienia zależeć będzie od poznania zachodzących zmian na poziomie molekularnym wybrała do badań kinazy ERK1/2, odgrywające znaczną rolę w plastyczności synaptycznej i mechanizmach powstawania uzależnień. Ze względu na społeczną wagę problemu, badania uzależnień od substancji narkotycznych są istotne, a ich zasadność nie może budzić najmniejszych wątpliwości. Pragnę ponadto dodać, że przedstawiona w rozprawie „Bibliografia” jest niezwykle obszerna, zawiera 210 pozycji piśmiennictwa, w większości z lat ostatnich, wskazując na dobrą znajomość przedmiotu i dobre przygotowanie Doktorantki do wybranej tematyki badań.

3. Formalny opis rozprawy

Recenzowana praca liczy 146 stron, ma przejrzysty układ i składa się z 7. rozdziałów: „Wstępu”, „Założeń i Celów Pracy”, „Materiałów”, „Metod”, „Wyników”, „Dyskusji” oraz „Podsumowania i Wniosków”. Rozdział „Wstęp” jest poprzedzony „Streszczeniem” i „Wykazem Skróków”, a cała rozprawa kończy się „Bibliografią”, nie wydzieloną jako osobny rozdział. „Wykaz skróków” obejmuje aż 4. strony tekstu (str. 11-14), jest dogłębny i dokładny. Jest to zresztą wspólna cecha tej rozprawy, bowiem na uwagę zasługuje jej staranność i tylko nieliczna obecność tzw. literówek.

Moje zastrzeżenie budzi jedynie sposób przedstawienia „Streszczenia”, które jest zbyt obszerne, a nie powinno przekraczać najwyżej jednej strony tekstu. Ta drobna uwaga ma jednak charakter porządkowy i nie przekreśla dodatniej opinii przedstawionej powyżej. Po rozdziale „Dyskusja” omawiającej wybrane, najważniejsze problemy naukowe, praca kończy się rozdziałem „Podsumowanie i Wnioski” sformułowanym prawidłowo, logicznie i adekwatnie do zawartości rozprawy.

4. Ocena merytoryczna

Rozdział „Wstęp” omawia wiele interesujących danych. W pierwszym podrozdziale Doktorantka opisuje opioidy i przedstawia morfinę jako substancję opioidową. W drugim zajmuje się morfiną jako substancją uzależniającą, wybranymi modelami zwierzęcego uzależnienia oraz zmianami molekularnymi wywołanymi przez jej podawanie. Wreszcie w trzecim omawia rolę kinaz ERK, ich działanie w układzie nerwowym, a w szczególności rolę w uzależnieniu od opiatów.

Omawiając ten rozdział mam kilka pytań dotyczących białek Go. Białka Go występują obficie w mózgu, gdzie stanowią więcej niż 1% wszystkich białek błon. Morfina wiąże się głównie z receptorem opioidowym typu μ , który po stymulacji aktywuje zarówno białka Gi jak i Go. Będę wdzięczna za wyjaśnienie: (1) Czy powinowactwo receptora μ do obu białek G jest podobne? (2) Czy poszczególne struktury mózgu różnią się między sobą zawartością tych białek? (3) Czy fakt, że białko Go odpowiada za aktywację fosfolipazy A_2 może odgrywać rolę w procesie uzależnienia od morfiny? (4) Czy kompleks podjednostek β/μ białka Go oddziałuje na podobne efektory jak kompleks β/μ białka Gi? (5) Czy uzależniające działanie morfiny i związany z tym proces tolerancji, różny w różnych strukturach mózgu, może być wynikiem nie tylko wielokierunkowego oddziaływania morfiny na wewnątrzkomórkową transdukcję sygnału, ale mieć pierwotne źródło w sprzężeniu receptora bądź z jednym bądź z drugim białkiem G? Chciałabym wiedzieć, czy są znane odpowiedzi na te pytania.

Ponadto chciałabym sprostować pewne nieścisłości dotyczące małych białek G oraz roli podjednostek β/μ białka Gi w transdukcji sygnałów prowadzących do aktywacji kinaz ERK.

Doktorantka pisze (str. 24, 4 linia od góry) „Dodatkowo podjednostka β/μ może bezpośrednio aktywować Ras, małe białko o aktywności GTPazowej”. Podobne, bezpośrednie działanie tych podjednostek zostało przez Doktorantkę uwidocznione na Rycinie 1. (str. 32. rozprawy). Otóż białko Ras (a także białko Rap i RhoA, str. 23), tak jak wszystkie monomeryczne, małe białka G (w odróżnieniu od trójpodjednostkowych białek G) ma słabą, ukrytą aktywność GTPazową. Jej wyzwolenie nie następuje samoistnie, ale dopiero po interakcji z określonym innym białkiem, białkiem typu GAP (GTPase activating protein). Dopiero wtedy zachodzi hydroliza GTP do GDP i małe białka G przestają być aktywne. Dlatego należy używać określenia – małe białka G, lub małe białka GTPazowe, a nie – małe białka o aktywności GTPazowej. Podobnie, aby białko Ras stało się aktywne i mogło aktywować serynowo- treoninową kinazę Raf-1 rozpoczynającą kaskadę MAP kinaz, musi najpierw wejść w interakcję z innym białkiem, tym razem typu GEF (guanine nucleotide exchange factor), stymulującym w białku Ras wymianę GDP na GTP (takim białkiem GEF jest np. białko Sos). Dlatego, zgodnie z moją wiedzą, kompleks β/μ białka G_i , nie należąc do białek GEF, nie może bezpośrednio aktywować białka Ras. Natomiast może pośrednio uczestniczyć w aktywacji Ras i Raf-1, co zresztą częściowo przedstawia Ryc. 1. Ta złożoność i kompleksowość zachodzących procesów pokazuje jak na poziomie molekularnym interpretacja wyników badań prowadzących przez Doktorantkę jest trudna.

Rozdział „Założenia i Cele Pracy” jest napisany jasno. Cele pracy korespondują z uzyskanymi wynikami przedstawionymi w rozdziale „Podsumowanie i Wnioski”.

Następne dwa rozdziały „Materiały” i „Metody” omawiają stosowane metody i materiały niezbędne dla realizacji zamierzonych celów. Rozdziały te świadczą o bardzo dobrym warsztacie metodycznym Doktorantki. Czytelnik znajdzie tu opis zwierząt używanych do badań, warunki eksperymentów, a także opis testów behawioralnych takich jak warunkowa preferencja miejsca. Podane są również metody używane w badaniach biochemicznych i immunohistochemicznych prowadzonych w określonych strukturach mózgu: prążkowi, ciele migdałowatym, hipokampie i korze czołowej. Doktorantka opisuje także badania poziomu RNA wybranych genów potencjalnie związanych z ERK1/2. Poziom i rozmieszczenie kinaz ERK1 i ERK2, białek i fosforylowanych form, oznaczano metodą Western blot i analizowano metodami immunohistochemicznymi. Wpływ morfiny badano dwojako, albo podając myszom dootrzewnowo jedną dawkę morfiny (10 mg/kg) – jednorazowe podawanie morfiny, albo wielokrotnie – przewlekłe podawanie morfiny. Te ostatnie badania prowadzono podając zwierzęciu 2x dziennie wzrastające dawki morfiny (od 10 do 100 mg) przez okres 10 dni. Takie postępowanie prowadzi do rozwoju tolerancji i uzależnienia. Mam pytanie. A co by było gdyby podawano stale tą samą dawkę? Morfinę, jako lekarstwo przeciwbólowe podaje lekarz pacjentowi wielokrotnie, starając się nie podnosić dawek.

Niewątpliwie do istotnych rozdziałów rozprawy zaliczyć należy „Wyniki” i ich „Dyskusję”, których treść będę omawiać wspólnie. Badania opisane w rozdziale „Wyniki” podzielono na 4 części. Przedstawiają one kolejno: podstawowy, wyjściowy poziom białek kinaz ERK1 i ERK2 i ich fosforylowanych form, wpływ morfiny w modelu jednorazowego, a także przewlekłego podawania, oraz wyniki badań behawioralnych prowadzonych w modelu warunkowej preferencji miejsca. „Dyskusja” przyjmuje ten podział, wydzielając jako dodatkowy podrozdział omówienie ekspresji poziomu RNA wybranych genów.

Pomiar podstawowego, bez podawania morfiny poziomu kinaz ERK1 i ERK2 wykazał ich obecność we wszystkich badanych strukturach mózgu, przy czym zarówno poziom całkowitego białka ERK2, jak i jego fosforylowanej formy był wyższy niż ERK1. Wynik ten nie dziwi, bowiem kinazy ERK, a szczególnie ERK2, jak pisze Doktorantka, odpowiadają za przeżywalność neuronów, plastyczność synaptyczną, pamięć i proces uczenia. Najwyższy poziom białek ERK1 i ERK2 zaobserwowano w ciele migdałowatym, następnie w hipokampie i prążkowie, a najniższy w korze czołowej. Doktorantka we „Wstępie” i „Dyskusji” omawia znaczenie kinaz ERK w badanych strukturach, szczególną uwagę poświęcając roli hipokampa.

Wpływ morfiny na poziom białek i fosforylowanych form kinaz ERK1 i ERK2 badano w powyższych strukturach mózgu w modelu jednorazowego lub przewlekłego jej podawania, a także identyfikowano fenotypy komórek zawierających te kinazy. Stwierdzono, że zarówno jednorazowe, jak i przewlekłe podawanie morfiny nie wywierało żadnego wpływu na całkowity poziom białek ERK1 i ERK2, natomiast wyraźnie wpływało na proces fosforylacji tych kinaz. Przy podawaniu jednorazowym, za wyjątkiem kory czołowej, wykazano długotrwały (do 4 h) wzrost fosforylacji ERK1 i ERK2 we wszystkich badanych strukturach, przy czym najwcześniejszą odpowiedź, już po 20 min od podania morfiny obserwowano dla hipokampa. Wyniki te zostały potwierdzone przez analizę stereologiczną, a fenotyp komórek w hipokampie, w którym dochodziło do aktywacji ERK1/2 po morfinie (obszar CA3) wykazał, że są to neurony glutaminianergiczne. Przy wielokrotnym podawaniu morfiny jej efekt na fosforylację ERK1 i ERK2 był zróżnicowany. I tak, w ciele migdałowatym poziom fosforylacji obu kinaz obniżał się, w korze czołowej podwyższał, w prążkowie pozostawał bez zmiany, a w hipokampie fosforylacja białka ERK1 nie zmieniała się, podczas gdy ERK2 wzrastała dwukrotnie. Powyższe wyniki zostały dogłębnie i wyczerpująco przedyskutowane w „Dyskusji”. Doktorantka zwraca uwagę na rolę kinazy ERK2 w hipokampie, kinazy której fosforylacja przy przewlekłym podawaniu morfiny selektywnie wzrasta, co może świadczyć zarówno o specjalnym znaczeniu tej struktury, jak i tej kinazy w procesie uzależnienia. Z kolei, brak zmian w fosforylacji ERK1 w hipokampie może według Doktorantki świadczyć o jej udziale w procesie tolerancji.

Moje zainteresowanie wzbudziło ciało migdałowate, struktura charakteryzująca się w próbach bez podania morfiny najwyższym poziomem białka i fosforylowanych form obu kinaz ERK, podczas gdy po jednorazowym podaniu morfiny następował wzrost, a po przewlekłym spadek fosforylowanych form. Doktorantka ciekawie tłumaczy to zjawisko poprzez pośredni udział morfiny na receptory dopaminowe. Morfina działa bowiem na układ dopaminoergiczny, powodując wzrost zewnątrzkomórkowego poziomu dopaminy, która w ciele migdałowatym działając na receptor D1 związany z białkiem Gs może prowadzić do aktywacji kinaz ERK. Przewlekłe podawanie opioidów prowadzi do spadku receptora D1 w tej strukturze, co w konsekwencji może powodować osłabienie aktywności obu kinaz ERK1 i ERK2, przy czym tak jak w hipokampie rola ERK2 w procesach uzależnienia wydaje się i tu być wiodącą. Powyższe obserwacje interesująco podkreślają synergistyczne współdziałanie receptorów opioidowych i dopaminowych w odpowiedzi na morfinę.

Następna część pracy dotyczy badań behawioralnych prowadzonych zgodnie z modelem warunkowej preferencji miejsca wywołanej podawaniem morfiny. Morfinę podawano myszom w jednej dawce (10 mg/kg), raz dziennie, na zmianę z solą fizjologiczną jako kontrolą. Po trzecim podaniu, w 7. dniu eksperymentu zwierzęta dekapitowano albo po 4 h, albo po 24 h od ostatniego podania leku (bezpośrednio po post-teście). Doświadczenia prowadzono w specjalnej dwuramiennej aparaturze, składającej się z komór, szczegółowo opisanej w rozprawie, łącznie z przebiegiem prowadzonych w niej eksperymentów. Jako kontrolę porównawczą wobec zwierząt poddawanych procedurze post-test, używano myszy traktowanych identycznie ale trzymany w klatkach domowych. Po dekapitacji, w wybranych jak powyżej strukturach mózgu oznaczano zmiany poziomu kinaz ERK1 i ERK2, białka całkowitego i fosforylowanych form, analizowano stereologicznie liczbę komórek ERK1/2 pozytywnych, badano ich fenotyp, a także analizowano wpływ morfiny na ekspresję genów związanych z ERK1 i ERK2. Jest to jedynie pobieżny opis działań Doktorantki związanych z tą częścią rozprawy, tak obszernej, że mogłaby sama stanowić oddzielną całość. Dlatego chciałabym odnieść się tylko do tych wyników, które wzbudziły moje specjalne zainteresowanie.

Wyniki eksperymentów behawioralnych, przedstawione w postaci zmian poziomu ERK1 i ERK2, białka całkowitego i fosforylowanych form, pokazuje zbiorczo Tabela 10. (str. 103). I tak, w prążkowi, 4 h po trzeciej dawce morfiny nie zaobserwowano zmian w poziomie ERK1 i ERK2, form fosforylowanych i białek całkowitych. Podobny wynik uzyskano dla prążkowie jako całej struktury, 24 h po ostatnim podaniu morfiny (str. 88). Jednak, kiedy analizowano poszczególne części prążkowie u zwierząt tak traktowanych, bezpośrednio po post-teście, analiza stereologiczna komórek pERK1/2 pozytywnych wskazała na ich wyraźny wzrost w grzbietowym prążkowie. Takiego wzrostu nie obserwowano ani w rdzeniu jądra półleżącego, ani w skorupie jądra

pótleżącego prążkowania. Ten wynik spowodował korektę i w efekcie prążkowie w Tabeli 10. zostało przedstawione jako struktura, w której warunkowanie morfiną powoduje wzrost poziomu fosforylowanych form kinaz ERK1/2 (pERK1/2). Obserwacja ta pokazuje, że różne części tej samej struktury mózgu mogą reagować całkowicie odmiennie. W tym przypadku to właśnie grzbietowa część prążkowania wydaje się mieć istotne znaczenie w nawykowym poszukiwaniu morfiny. Uświadamia to jak trudna i częstokroć mylna może być interpretacja wyników bez żmudnego wnikania w szczegóły.

W pozostałych badanych strukturach mózgu: ciele migdałowatym, hipokampie i korze czołowej, u zwierząt warunkowanych morfiną bezpośrednio po post-teście, obserwowano spadek aktywności pERK1 i pERK2 (Tabela 10). Badania poszczególnych części tych struktur także pokazały spadek komórek ERK1/ERK2 pozytywnych – w hipokampie w regionie CA3, a ciele migdałowatym w jądrze środkowym i podstawnym, ale nie w bocznym. Doktorantka interpretuje te wyniki jako uczenie się kontekstu związanego z nagrodą i jako powstawanie pamięci uzależnienia. Dodatkowo, aktywność pERK1 i pERK2 w korze czołowej może być związana z osłabieniem transmisji dopaminoergicznej, której sygnalizacja z udziałem kinaz ERK jest też związana z pamięcią o nagradzającym działaniu morfiny.

Interesującym wynikiem jest obserwowany w trzech powyższych strukturach mózgu, u zwierząt bezpośrednio po post-teście, spadek całkowitego poziomu białka ERK1, ale nie ERK2 (Tabela 10). Wśród wielu obserwacji przedstawionych w tej rozprawie ta wydaje mi się chyba najciekawszą. W ciele migdałowatym ze spadkiem poziomu białka ERK1 następuje równoczesny spadek poziomu mRNA genu ERK1, ale nie mRNA genu ERK2. A więc wynik ten nie jest przypadkowy, podanie morfiny skojarzone z bodźcem środowiskowym istotnie wywołuje taki skutek. Należy dodać, że przy przewlekłym podawaniu morfiny, jej bardzo wysokie wielokrotne dawki nie wpływały na poziom białka ERK1 i ERK2, choć w różny sposób wpływały na aktywność tych białek. Ten utrzymujący się, nie ulegający zmianom, stały poziom białek jest prawdopodobnie gwarancją prawidłowego działania mózgu. Badania prowadzone 24 h po ostatnim podaniu morfiny, bezpośrednio po post-teście, pokazały, że białko kinazy ERK2, uważane przez Doktorantkę za pełniące wiodącą rolę w uzależnieniu, jest białkiem stabilnym, co dowodnie wskazuje na tę jego rolę. Natomiast spadek poziomu białka ERK1 wskazuje na zaburzenie, zahamowanie przez morfinę aktywności neuronalnej. Ciekawe, że przewlekłe podawanie morfiny, przy tak wielkich dawkach, takiego skutku nie wywoływało?

5. Uwagi końcowe

Przedstawiona do oceny praca zawiera w mojej ocenie materiał tak obszerny, że mógłby stanowić temat dwóch, a nie jednej pracy doktorskiej. Wyniki badań przedstawione w rozprawie

można bowiem podzielić na dwie części, część dotyczącą ekspresji kinaz ERK przy jednorazowym lub przewlekłym podawaniu morfiny (23 stron rozdziału „Wyniki”), oraz część dotyczącą badań behawioralnych (28 stron). Wskazuje to na ogrom pracy wykonanej przez Doktorantkę.

Ponadto, praca jasno przedstawia jak niezwykle trudna na poziomie molekularnym jest wybrana przez Doktorantkę tematyka badań. Zaczynając od doświadczeń typu *in vivo*, poprzez wybranie jako obiektu badań mózgu i jego struktur, których poszczególne części reagują odmiennie, przez badanie wpływu morfiny wchodzącej w interakcję nie tylko z jednym typem receptora, dochodząc w końcu do receptora opioidowego μ , który wchodzi w interakcję zarówno z białkiem G_i , jak i G_o , wreszcie do podjednostek β/μ białka G_i oddziałujących pośrednio na wiele szlaków sygnalizacyjnych prowadzących do aktywacji kinaz ERK – to wszystko pokazuje jak ambitne zadanie postawiła przed sobą Doktorantka.

Dlatego stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska ma zdecydowanie charakter pionierski i jest ciekawym opracowaniem, stanowiącym rzeczywisty i nowatorski wkład do postępu wiedzy. Doktorantka wykazuje dobrą znajomość badanej tematyki i odczytanie. Posługuje się różnorodnym warsztatem naukowym i prawidłowo wyciąga wnioski. Należy dodać, że zakres prac badawczych ma tu charakter nie tylko poznawczy ale również praktyczny, można mieć nadzieję, że badania te przyczynią się do bardziej skutecznych terapii przeciwko uzależnieniu od opioidów.

W związku z powyższym uważam, że rozprawa doktorska pani magister Agnieszki Wawrzczak-Bargiely zasługuje na bardzo pozytywną ocenę i spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1. Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). **Składam zatem wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja w Krakowie, o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Wawrzczak-Bargiely do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, ze względu na rangę podjętej tematyki wysuwam recenzowaną pracę pani mgr Agnieszki Wawrzczak-Bargiely pt. „Wpływ morfiny na aktywność kinaz ERK w wybranych strukturach mózgu myszy” do wyróżnienia.

Jolanta Baran'ska