

UNIwersytet Zielonogórski

Instytut Nauk o Zdrowiu, Zakład Farmakologii i Toksykologii

65-516 Zielona Góra, ul. prof. Z. Szafrana 4a
e-mail: elapharm@ump.edu.pl

Zielona Góra, 09.12.2022

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Chorążka
z Zakładu Biochemii Mózgu Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

**pt. „Analiza funkcjonalnego zróżnicowania podtypów receptorów
alfa 1-adrenergicznych w efektach leków przeciwdepresyjnych; badania
w genetycznych modelach in vitro i in vivo”**

Promotor: prof. dr hab. n.med. Irena Nalepa

Promotor: prof. dr hab. n. med. Wojciech Piekoszewski

Zaburzenia depresyjne dotyczą coraz większej liczby osób na świecie; szacuje się, że 12% ogólnej populacji choruje na depresję, a liczba ta zwiększa się z różnych powodów, m.in. z braku powszechnego dostępu do lekarza i wyboru odpowiedniej terapii. Mamy coraz więcej nowoczesnych leków stosowanych w leczeniu depresji, ale skuteczność ich jest ograniczona z powodu lekooporności, nasilających się działań niepożądanych, braku przestrzegania zaleceń terapeutycznych związanych między innymi z koniecznością przewlekłego stosowania leków przeciwdepresyjnych.

Depresja to choroba heterogenna, na jej występowanie i rozwój mają wpływ zarówno czynniki biologiczne, genetyczne, psychospołeczne i środowiskowe.

W patomechanizmie depresji, istotną rolę odgrywają dysfunkcje dotyczące wydzielania amin biogennych, ale teoria monoaminowa nie wyczerpuje wszystkich mechanizmów związanych z chorobą i stosowanymi lekami. Literatura podkreśla znaczenie wpływu innych mechanizmów m. in. molekularnych i neurobiologicznych. Główną metodą leczenia depresji

jest terapia farmakologiczna, mająca normalizować poziomy neuroprzekazników i w efekcie końcowym prowadzić do ustąpienia objawów depresji. Natomiast ciągle trwają badania mające na celu potwierdzić dotychczasowe teorie dotyczące depresji, ale poszukuje się też nowych hipotez, które pozwolą na wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za występowanie tej choroby.

Wielu badaczy próbuje wyjaśnić mechanizm odpowiedzialny za działanie terapeutyczne leków przeciwdepresyjnych (badania dotyczące ekspresji genów, wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania sygnału, badania nad rolą BDNF w odnowie neuronów i inne), stąd nie ma wątpliwości, że tematyka podjęta przez Doktorantkę jest aktualna ze względu na podejmowane dotychczas badania i liczne publikacje dotyczące próby wyjaśnienia patomechanizmu depresji. Potrzebne są nowe strategie w leczeniu tej choroby, takie badania, które pozwolą poznać mechanizmy bezpośrednio odpowiedzialne za uzyskanie efektu przeciwdepresyjnego stosowanych leków.

Biorąc pod uwagę powyższe należy uznać, że wybrana przez Panią magister Katarzynę Chorążkę tematyka, która stała się podstawą rozprawy doktorskiej, jest aktualna, o istotnym naukowym znaczeniu.

Zasadniczym celem pracy było zbadanie, czy udział i funkcjonalność receptorów adrenergicznych α_1 w efektach działania leków przeciwdepresyjnych są zróżnicowane w zależności od podtypów tych receptorów.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania przeprowadzono w ramach projektu badawczego finansowanego przez NCN pt.: „Różnicowanie udziału trzech podtypów receptora alfa (1) adrenergicznego w efektach leków przeciwdepresyjnych: badania w oparciu o genetyczne modele in vitro oraz in vivo” (OPUS 9NR2015/17/B/NZ/03018 - kierownik projektu: prof. dr hab. Irena Nalepa).

Ocena formalna i merytoryczna pracy

Recenzowana rozprawa posiada klasyczny układ dla prac doktorskich – streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp (24 strony), cel pracy (2 strony), materiały i metody (24 strony), wyniki badań przedstawiono na 45 stronach, dyskusja (15 stron) i wnioski końcowe (1 strona). Do pracy dołączono nienumerowane piśmiennictwo - 31 rycin i 24 tabele, oraz spis treści i wykaz skrótów. Łącznie praca zawiera 158 stron. Struktura recenzowanej pracy jest co do zasady prawidłowa. Zastrzeżenia budzi rozdział 5 - moim zdaniem dyskusję należy potraktować jako oddzielny rozdział, podobnie wnioski, w tym przypadku nie rozumiem

sformułowania wnioski końcowe, które kończy się formułą podsumowującą? nie wiem jak potraktować podsumowanie na str.126 (ramka), może należy dodać do wniosków?

Co ważne, materiał zawarty w dysertacji został częściowo opublikowany w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (w 4 pracach Doktorantka jest współautorem), oraz przedstawiony w formie doniesień zjazdowych (21).

Rozprawę doktorską rozpoczyna **WSTĘP**, który jest bardzo ważny z punktu widzenia pomysłu badawczego i konieczności przekonania czytającego dlaczego podjęcie się wskazanego tematu jest ważne. W tej części autorka pracy dokonuje podziału receptorów adrenergicznych, identyfikuje podtypy tych receptorów wskazując, że wszystkie trzy podtypy α_1 receptorów adrenergicznych mimo, że aktywują ten sam główny szlak sygnałowy, to profile zmian ekspresji genów wywołanych w komórce za ich pośrednictwem nie są takie same. Dalej omawia rolę tych receptorów w układzie sercowo naczyniowym i moczowo-płciowym, wskazując jednocześnie na dotychczas fragmentarycznie poznaną ich rolę w ośrodkowym układzie nerwowym.

Dalej wskazuje na metody leczenia depresji dokonując podziału leków p/depresyjnych z omówieniem ich mechanizmu działania, wskazuje również na ważną rolę pierwiastków takich jak lit, cynk, miedź, magnez, czy wapń w leczeniu zaburzeń depresyjnych. W dalszej części wstępu autorka dysertacji omawia zmiany adaptacyjne zachodzące po jednorazowym i wielokrotnym podaniu leków p/depresyjnych konkludując na bazie przytoczonych danych literaturowych, że leki p/depresyjne o różnych mechanizmach działania powodują podobne zmiany adaptacyjne receptorów adrenergicznych α_1 po podaniu jednorazowym jak i wielokrotnym. Autorka podkreśla, że niektóre aspekty monoaminergicznej teorii depresji wymagają pogłębienia badań; z założenia leki p/depresyjne wykazują efekt terapeutyczny po ich wielokrotnym podaniu, ale nasilenie transmisji monoaminergicznej wielu autorów obserwowało już po pojedynczym podaniu leków. Nie wskazano również na p/depresyjne działanie związków, które nasilają uwalnianie monoamin do szczeliny synaptycznej np. dla amfetaminy. Nowy lek p/depresyjny - tianeptyna nasila wychwyt serotoniny, a więc zarówno inhibitory selektywnego wychwyty serotoniny (fluoksetyna) jak i aktywatory (tianeptyna) działają p/depresyjnie, co nie przemawia w tym przypadku za teorią, że działanie p/depresyjne leków wynika wyłącznie ze zmiany nasilenia transmisji serotoninowej.

Te i inne teorie (monoaminergiczna, neuroplastyczna, kortykosteroidowa, immunologiczna, glutaminianergiczna) czy reprezentowana przez Dumana neurotroficzna hipoteza depresji, nie tłumaczą w pełni patofizjologii depresji, a mechanizmy działania leków p/depresyjnych nie są w pełni wyjaśnione.

Lektura wstępu dowodzi, że w toku badań Doktorantka postawiła sobie cel pragmatyczny zwiększenia wiedzy na temat roli receptorów α_1 -adrenergicznych, a szczególnie ich podtypów w działaniu leków p/depresyjnych. Badania nad rolą tych receptorów mogą być w przyszłości innowacyjną metodą farmakoterapii depresji.

Wstęp został opracowany w przystępny sposób z wykorzystaniem aktualnego piśmiennictwa i utwierdza Recenzenta w przekonaniu o celowości podjętych przez Doktorantkę badań. Dodam, że dobrze byłoby gdyby Doktorantka próbowała zamieścić w rozprawie osobny akapit w którym podsumowałaby uzasadnienie wyboru tematu badawczego i podkreśliła swój osobisty wkład w rozwiązanie założonego problemu badawczego.

Główny cel i cele szczegółowe pracy są sformułowane poprawnie i precyzyjnie, które zamieszczono w formie oddzielnego rozdziału.

Głównym celem pracy było zbadanie, czy funkcjonalny udział receptorów adrenergicznych α_1 w efektach indukowanych przez leki p/depresyjne jest zróżnicowany w zależności od podtypu receptora α_1 . Po lekturze rozprawy jestem przekonana, że zakładany cel główny jak i pięć celów szczegółowych zostały przez Doktorantkę osiągnięte, stąd mogę stwierdzić, że kluczowy dla oceny pracy doktorskiej aspekt jakim jest postawienie i udowodnienie tezy (czy hipotez) zostało spełnione.

Materiały i metody użyte w pracy są wybrane prawidłowo opisane w dokładny, jasny sposób. Badania wykonano w genetycznych modelach in vitro z wykorzystaniem trzech linii komórkowych ze stabilną ekspresją pojedynczego podtypu receptora adrenergicznego α_1 celem określenia czy leki p/depresyjne z różnych grup działają na aktywację poszczególnych podtypów receptorów adrenergicznych α_1 . Badania in vivo wykonano z udziałem trzech mysich linii transgenicznych typu knockout z selektywnym unieczynnieniem genu kodującego pojedynczy podtyp receptora adrenergicznego α_1 .

Hodowlę zwierząt prowadzono w standardowych warunkach bytowania o odpowiedniej temperaturze (23-24 st. C), wilgotności (25-45%) z zachowaniem naturalnego 24h cyklu dobowego z dostępem do wody i pożywienia

Procedury wykonane na zwierzętach uzyskały pozytywną opinię Lokalnej Komisji Etycznej przy Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk (uchwała nr 1233/2015), a hodowla mysich linii transgenicznych prowadzona była w oparciu o zgodę na zamknięte użycie GMO klasy I uzyskaną z Ministerstwa Środowiska (Decyzja nr 59/2013, Decyzja nr 161/2018).

Plan doświadczeń i dobrane metody badawcze nie budzą zastrzeżeń i zapewniły realizację zakładanych celów badań. Doktorantka opanowała różnorodny i nowoczesny warsztat badawczy, co podkreślam jest nie lada wyzwaniem dla młodego naukowca. Metody statystyczne wykorzystane w pracy są dobrane i wykorzystane prawidłowo. Nie rozumiem tylko sformułowania na str.65 „jeśli nie opisano inaczej”. Należy również doprecyzować w tej części str. 65 zastosowane metody statystyczne.

Wyniki badań - w tej części Doktorantka szczegółowo zaprezentowała uzyskane w trakcie badania rezultaty, które zostały przedstawione w sposób przejrzysty, z zastosowaniem dobrze opracowanych graficznie tabel i rycin. Uzyskane wyniki wskazały, że leki przeciwdepresyjne działają antagonistycznie względem receptorów α_1 adrenergicznych a najsłabszy efekt był obserwowany w stosunku do podtypu receptora α_{1B} .

W badaniach *in vitro* wskazano, że długotrwałe działanie leków p/depresyjnych na α_1 receptor prowadzi do nasilenia przekazu sygnału noradrenergicznego za pośrednictwem podtypu receptora α_{1B} w wyniku działania imipraminy lub dezipraminy, oraz za pośrednictwem receptorów α_{1A} i α_{1B} w wyniku działania citalopramu, na skutek zwiększenia ich reaktywności na noradrenalinę. Badane leki p/depresyjne wykazały znaczący efekt antagonistyczny względem podtypu receptora α_{1D} co korelowało z wynikami w modelach *in vivo*. Autorka dysertacji odnosząc się do publikacji na temat roli różnych pierwiastków w farmakoterapii depresji dokonała oznaczeń poziomu pierwiastków (wapnia, magnezu, miedzi i cynku) w jednej ze struktur mózgowych (wzgórzu) szczurów obu płci stwierdzając, że unieczynnienie któregośkolwiek z podtypów α_1 receptorów adrenergicznych powoduje wzrost poziomu Cu w wybranej do badania strukturze mózgowej, ale pozostaje bez wpływu na poziom Zn. Wynik ten koreluje z doniesieniami literaturowymi wskazującymi, że zaburzenia równowagi pomiędzy Cu i Zn obserwuje się u osób chorujących na depresję.

Szeroka dyskusja nad uzyskanymi wynikami w oparciu o dostępne piśmiennictwo potwierdza dociekliwość badawczą i krytyczne podejście Doktorantki do osiągniętych rezultatów.

Na bazie przeprowadzonych eksperymentów Kandydatka sformułowała wnioski nazwane przez Doktorantkę jako końcowe; zdaniem czytającego są logiczne i pozostają w zgodzie z przeprowadzonymi eksperymentami, chociaż może dobrze byłoby wyeksponować je w punktach i aby odnosiły się do postawionych celów pracy. Doktorantka wykorzystwała wiele istotnych pozycji bibliograficznych, większość z nich to publikacje międzynarodowe w języku angielskim, co świadczy o umiejętności wykorzystania przez Autorkę rozprawy bogatej literatury przedmiotu. Pod względem jakościowym literatura jest dobrana prawidłowo, jest

zróżnicowana i bogata, tym samym spełnia wymagania Ustawy w zakresie zgłębienia wybranego tematu i opanowania wiedzy z zakresu wybranej dyscypliny.

Ocena końcowa

Rozprawę doktorską mgr Katarzyny Chorążki oceniam bardzo wysoko, świadczy ona o wnikliwości badawczej Doktorantki oraz nabytej przez Nią umiejętności samodzielnego rozwiązywania problemów badawczych. Stwierdzam, że Kandydatka z sukcesem zrealizowała cel badawczy, praca posiada wysokie walory poznawcze i aplikacyjne oraz wnosi znaczny wkład do dziedziny nauki jaką jest farmakologia, co nie zaskakuje, biorąc pod uwagę światową pozycję Promotora w realizowanej przez Doktorantkę tematyce.

Uwagi i komentarze do pracy:

Dokładna lektura recenzowanej pracy nasuwa kilka uwag:

1. Streszczenie w języku polskim i angielskim zazwyczaj zamieszcza się na końcu dysertacji.
2. Załączone do opracowania piśmiennictwo nie zostało ponumerowane, co bardzo utrudnia identyfikację wyników z danymi literaturowymi.
3. Wykaz skrótów dobrze byłoby uporządkować według alfabety (początek), poza tym 5-HT-serotonina, można uzupełnić - 5-hydroksytrypamina, zamiast sal. użyć NaCl.
4. Praca zawiera trochę literówek, powtórzeń, czy niezręcznych sformułowań np. str. 31 zastanawiam się czy słowo „augmentacja” zostało właściwie użyte.
5. Nie rozumiem systemu numerowania tabel i rycin, które zastosowała w pracy Doktorantka.

Niezależnie od powyższych, drobnych niedociągnięć, pracę oceniam bardzo pozytywnie. Doktorantka w pełni zrealizowała obszerny zakres badań.

Dysertacja ma charakter innowacyjny, może być źródłem informacji na temat funkcji podtypów receptorów adrenergicznych α_1 zaangażowanych w działanie leków p/depresyjnych, a otrzymane wyniki mogą przyczynić się do poszukiwania nowych strategii leczenia osób cierpiących na depresję

Reasumując, uważam, że przedłożona do oceny praca doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. 2022, poz.574 z późn. zm.) i stawiam wniosek o dopuszczenie Pani Katarzyny Chorążka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne

[wszczętego na podstawie przepisów Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. 2022, poz. 574 z późn. zm.) w nawiązaniu do art.179 pkt. 7 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018, poz.1669 z późn. zm.)] skierowany do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk.



Prof. dr hab. Elżbieta Nowakowska

prof. zw. dr hab. farm.
Elżbieta Nowakowska

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Wnioskuje do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Chorążka pt.: „Analiza funkcjonalnego zróżnicowania podtypów receptorów alfa 1-adrenergicznych w efektach leków przeciwdepresyjnych; badania w genetycznych modelach in vitro i in vivo”.

Wniosek o wyróżnienie uzasadniam wysokim poziomem prezentowanych w rozprawie badań naukowych o interdyscyplinarnym charakterze, bardzo bogatym, wnikliwie zinterpretowanym materiale doświadczalnym. Nowatorski charakter tych badań, istotnie poszerzający stan wiedzy, oraz sposób rozwiązania przedstawionych problemów badawczych świadczy jednoznacznie o wysokim poziomie naukowym reprezentowanym przez Panią mgr Katarzynę Chorążka.

Pragnę także zwrócić uwagę na wysoki poziom aplikacyjny prezentowanych w rozprawie badań.

2. pomyślenie
Elżbieta Nowakowska

prof. zw. dr hab. farm.
Elżbieta Nowakowska