

Prof. dr hab. Jerzy Kwapuliński
ul. Mikusińskiego 149/25
40-146 Katowice

22.11.2022 Sosnowiec

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Chorążkiej pt. „Analiza funkcjonalnego zróżnicowania podtypów receptorów alfa₁-adrenenrgicznych w efektach leków przeciwdepresyjnych: badania w genetycznych modelach in vitro i in vivo”, wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk po opieką naukową prof. dr hab. Ireny Nalepy oraz prof. dr hab. Wojciecha Piekoszewskiego.

Zaangażowanie podtypów α_1 -AR w etiologię, patofizjologię i farmakoterapię zaburzeń psychicznych m. in. depresja jest jak wskazuje dotychczasowe piśmiennictwo bardzo zróżnicowane. Badania są także utrudnione m. in. ze względu na brak wysoce selektywnych ligandów zdolnych do przekraczania bariery krew-mózg i wysoce specyficznych przeciwciał.

Analiza piśmiennictwa przeprowadzona przez Katarzynę Chorążką wykazała, że nadal w dużej mierze niewyjaśnione pozostają specyficzne funkcje regulowane przez podtyp α_1 -AR. Zatem to był obszar naukowych i badawczych zainteresowań Doktorantki. Zatem nowością naukową było przekonanie Katarzyny Chorążka, „że zdefiniowanie funkcjonalnego zróżnicowania podtypów α_1 -AR w efektach LPD jest kluczowe do zwiększenia skuteczności, szybkości i bezpieczeństwa farmakoterapii depresji”. Ten pogląd ma także aspekt pragmatyczny.

W nawiązaniu do przeprowadzonej szczegółowej analizy piśmiennictwa Doktorantka, jako zasadniczy cel badawczy obrała ustalenie: czy udział i funkcjonalność α_1 -AR w efektach LPD są zróżnicowane w zależności od podtypu α_1 -AR. Wykorzystała w tym celu genetyczne

modele *in vitro* i *in vivo*. Na str. 40 i 41 podano szczegółowe cele badawcze. Doktorantka chce uzyskać odpowiedź na następujące pytania:

- ✓ czy i w jaki sposób LPD z różnych grup wpływają na indukowaną przez antagonistę aktywację poszczególnych podtypów α_1 -AR uwzględniając krótko i długotrwałe oddziaływania LPD na receptor,
- ✓ jaki jest wpływ mutacji na gęstość receptorów adrenergicznych α_1 , α_2 i β w mózgu za pomocą autografii,
- ✓ jaki jest wpływ mutacji na tkankowe poziomy neurotransmiterów monoaminergicznych i ekspresję białek apoptycznych,
- ✓ w jaki sposób dana mutacja wpływa na efekty związane z długotrwałym stosowaniem dezipraminy i milnacipramu w mózgu ze względu na płeć na różnych poziomach molekularnych.

Z obowiązku recenzenta chcę podkreślić, że świadczy to o dużej dojrzałości naukowej i kompetencjach badawczych. Wybór szczegółowych celów badań wyczerpują całkowicie główny cel badawczy, który uzasadnia starania Katarzyny Chorążkiej o stopień doktora nauk medycznych. Co więcej przyjęty obszar badań mieści się w nurcie badań podejmowanych przez renomowane zagraniczne ośrodki naukowe.

Wyniki tych badań niewątpliwie pogłębiają wiedzę na temat roli podtypów α_1 -AR w efektach działania LPD, co ma duże znaczenie jak zauważyła Doktorantka dla potencjalnego rozwoju nowych form terapii depresji.

Dla realizacji celów badawczych wykorzystwała modele genetyczne *in vitro* i *in vivo*, bardzo dokładnie opisanych na stronach 42-65. Budzi moje uznanie szczegółowość opisu i wszechstronna swoboda badawcza w wyborze poszczególnych rodzajów doświadczeń, oznaczeń i stopień wykorzystania do interpretacji wyników metod statystycznych, co czyni uzyskany obraz wyników, jako bardzo wiarygodny.

W tym miejscu zapytam, czym kierowano się, że podano tylko niektóre odchylenia standardowe np. rys. 43 str. 70.

Uzyskane szczegółowe spostrzeżenia lub wnioski posiadają walor nowości naukowej uzyskane na podstawie wdrożonych elementów o wysokiej kulturze laboratoryjnej. W przeprowadzonej dyskusji wyników badań przekonująco scharakteryzowała pole i zakres badań.

Z obowiązku recenzenta chcę podkreślić, że przedstawione wyniki badawcze oraz wnioski stanowią kompleksową całość i są nowatorskie w zakresie farmakoterapii i genetyki medycznej.

Szczegółowe wyniki dotyczące depresji są pierwszymi i kolejnymi danymi ważnymi dla orzecznictwa farmakologicznego i medycznego. To praktyczny aspekt w dziedzinie farmakologii regulacyjnej. Znaczenie naukowe i praktyczne osiągniętych wyników polega na tym, że uzupełniają wiedzę o roli podtypów α_1 -AR.

Trudno nie dostrzec, że Katarzyna Chorążka w okresie eksperymentów znacznie poszerzyła swoje kompetencje badawcze i formację naukową, co gwarantuje Jej skuteczną, samodzielną pracę naukową i widoczną umiejętność planowania samodzielnego prowadzenia badań, umiejętność współpracy z zespołami z innych ośrodków, z których korzystała.

W tym miejscu nasuwa mi się refleksja, że te badania i ten doktorat wcześniej nie byłyby możliwe. Około 30 lat musiało minąć by rozwój technik klonowania molekularnego i wykorzystanie modeli inżynierii genetycznej pozwolił Katarzynie Chorążka zbadać zróżnicowaną rolę podtypów α_1 -AR w regulację behawioru. Mam tu na myśli także publikację z 2013 r. w *Pharmacological Reports* zespołu Pani prof. Nalepy.

Wysoka wartość naukowo-poznawcza recenzowanej pracy doktorskiej mieści się w nurcie poszukiwań nowych strategii farmakologicznych i punktów uchwytu LPD, a także, że konsekwentnie przełamywała trudności związane z doбором odpowiednich linii lub odczynników testowych.

Dawno nie recenzowałem tak wszechstronnej i szczerzej w dokumentowaniu kroków pracy doktorskiej. Tutaj wybiórczo podam cytaty: „Pomimo niepowodzeń przy tworzeniu linii komórkowej ze stabilną ekspresją funkcjonalnego α_{1D} -AR nie zarzucono kolejnych prób wyeliminowania powyższego ograniczenia metodycznego”

Potem Katarzyna Chorążka podsumowuje, iż modele *in vitro* zweryfikowano pod kątem aktywności metabolicznej komórek i funkcjonalności podtypów α_1 -AR a ich charakterystyka kwalifikuje je do kolejnego etapu badań.

Dyskusję doktorantka przeprowadziła w oparciu o reprezentatywną literaturę przedmiotu wnikliwie porównuje, analizuje poszczególne spostrzeżenia. W recenzji nie sposób podkreślić wszystkie dokonania doktorantki, a jest ich na str. 11-126 wiele. Dlatego ograniczę się do istotnych o dużych walorach poznawczo-naukowych a mianowicie:

- wykazano, że leki (imipramina, dezipramina, mianseryna) hamowały aktywację wywołaną działaniem NA wszystkich podtypów α_1 -AR,
- w oparciu o model *in vivo* wskazano na istotną rolę podtypu α_1 -AR w transmisji noradrenergicznej w HY i procesach regulujących odpowiedź komórek na czynniki stresujące w HIP,

- wykazano w modelach *in vitro*, że unieczynnianie α_1 -AR może modulować efekty działania badanych leków w sposób złożony i zależny od podtypów α_1 -AR i płci,
- badania wskazują na istotną rolę podtypu α_1 -AR w działaniu MIL u samców w działaniu DMI u samic a także sugerują, że efekt ten może wynikać z kompensacji funkcji podtypu α_{1D} przez podtyp α_{1A} ,
- różnice międzypłciowe stwierdzono w zawartości badanych pierwiastków (Zn, Cu, Ca) w mózgu, jednak tutaj efekty działania badanych LPD nie były determinowane rodzajem podtypu α_1 -AR.

Zrealizowane przez K. Chorążka badania i uzyskane wyniki stanowią jej oryginalne osiągnięcie, dzięki ogromnego nakładu pracy.

W zakończeniu chciałbym podzielić się kilkoma uwagami, które mogą być wykorzystane przez Doktorantkę przy okazji publikacji wyników badań:

- ✓ jednostki aktywności Ci się nie używa, obecnie Bq,
- ✓ zamiast słowa np. poziom Ca winno być zawartość Ca itp.,
- ✓ słowo akumulacja dezorientuje, a w języku polskim ma znaczenie odwrotne np. normalny-anormalny, wszędzie winno się pisać kumulacji,
- ✓ w ryc. 48 str. 81 „wagi” zastąpić słowem ciężar,
- ✓ str. 102, 105 zamiast poziom fosforylacji po prostu fosforylacja i ekspresja białek.....,
- ✓ str. 31 i pozostałe powinno być jony Zn, Mg, Ca, Cu, Li,
- ✓ w 1.1.2 odnotowałem poprawnie „przy niższych stężeniach agonistów,
- ✓ str. 32 poprawnie „stężenie Zn, zwiększenie stężenia Ca.

Dobór piśmiennictwa i jego wykorzystanie, z bardzo przekonującym wiązaniem poszczególnych informacji, prowadzą Doktorantkę do poprawnych konkluzji i wytyczenia szczegółowego zakresu badań. W zestawieniu piśmiennictwa następujące odstępstwa:

- ✓ czasopisma podano w całości, bez stosowanych skrótów przykład poprawy str. 149 Nat. Rev. Neurosci. str. 141 Psychopharmacology,
- ✓ pierwsza nazwa czasopisma z dużej litery a pozostałe małymi literami.

Nadmieniam, że dostrzeżone uchybienia nie umniejszają naukowej i merytorycznej wartości recenzowanej rozprawy K. Chorążkiej.

W konkluzji recenzenta stwierdzam, że rozprawa doktorska K. Chorążkiej spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2022 poz. 574 z późn. zm.).

Stawiam wniosek o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne (Dz. U.

2022 poz. 574 późn. zm. w nawiązaniu do art. 179 pkt. 7 Ust. z dnia 3 lipca 2018r 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 PAN.

Pracę przedstawiam do wyróżnienia (w zał. dokument).

Skróty:

NA – noradrenalina

HY – podwzgórze

MIL – milnacipran

HIP – hipokamp

CIT – citalopram

DMI – dezipramina

LPD – leki przeciwdepresyjne



Wniosek o wyróżnienie pracy pt.: „Analiza funkcjonalnego zróżnicowania podtypów receptorów alfa1-adrenergicznych w efektach leków przeciwdepresyjnych: badania w genetycznych modelach *in vitro* i *in vivo*” Katarzyny Chorążkiej

Wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani Katarzyny Chorążka, bowiem poziom merytoryczny przeprowadzonej dyskusji, uzyskanych nowoczesnymi technikami inżynierii genetycznej i laboratoryjnej wyników jest bardzo wysoki.

Wnioski są naukowo-poznawcze bardzo wartościowe. Za wybitne uznaję wnioski Doktorantki, że: LPD działające antagonistycznie względem α_1 -AR wykazują najsłabsze oddziaływanie na podtyp α_{1B} i uzupełniły tę wiedzę o kolejne związki – DMI i CIT. Dostarczyły również nowych danych w nawiązaniu do długotrwałego oddziaływania LPD na α_1 -AR wskazując, że prowadzi ono do wyraźnego nasilenia przekazu sygnału noradrenergicznego za pośrednictwem podtypu α_{1B} w wyniku oddziaływania IMI lub DMI oraz za pośrednictwem α_{1A} i α_{1B} w wyniku działania CIT jako skutek zwiększenia ich reaktywności na NA.

