

Prof. dr hab. Teresa Zalewska

Zakład Neurobiologii Naprawczej

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

im. M. Mossakowskiego PAN

Rada Naukowa

Instytutu Farmakologii

im. Jerzego Maja PAN

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Chorążkiej p.t.

**Analiza funkcjonalnego zróżnicowania podtypów receptorów
alfa₁-adrenergicznych w efektach leków przeciwdepresyjnych:
badania w genetycznych modelach *in vitro* i *in vivo***

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Chorążkiej została wykonana w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk i w Uniwersytecie Jagiellońskim

Promotorzy rozprawy: prof. dr hab. Irena Nalepa i prof. dr hab. Wojciech Piekoszewski

Istotę przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej precyzyjnie wyjaśnia tytuł rozprawy. Podjęcie tego tematu badań uzasadnia zarówno bezwzględny, jak i względny, niedostateczny stan wiedzy definiującej udział podtypów receptorów alfa₁-adrenergicznych w efektach leków przeciwdepresyjnych (LPD). Otrzymane wyniki badań mogą stanowić przesłankę dla przyszłych strategii terapeutycznych, zwiększenia skuteczności i szybkości farmakoterapii depresji.

Rozprawa doktorska ma tradycyjną formę zwartego dzieła z klasycznym podziałem na wstęp, wyniki, i dyskusję zakończoną wnioskami. Rozprawa liczy 111 stron tekstu podstawowego. Tekst rozprawy poprzedza przejrzysty spis treści pozwalający na zapoznanie się z jej poszczególnymi częściami. We wstępnej części zamieszczony jest także wykaz stosowanych skrótów oraz zwięzłe streszczenie (w języku polskim i angielskim), zawierające krótkie uzasadnienie podjętego w rozprawie tematu, cel badań, najważniejsze metody i wnioski.

Ostatnim rozdziałem jest spis literatury. Piśmiennictwo obejmuje ważne i starannie wyselekcjonowane pozycje. Brak numerycznych oznaczeń kolejnych pozycji uniemożliwia jednak oszacowanie ich liczby. Sposób użycia danych literatury w tekście pracy wskazuje na racjonalne dokonanie ich wyboru.

Przejrzysty, podzielony na podrozdziały **Wstęp** (25 stron) ma walory dobrej pracy przeglądowej. Kandydatka wprowadza nas w przedmiot swoich zainteresowań, które w sposób naturalny wpisują się w długofalowy program badań grupy prof. dr hab. Ireny Nalepy. W kolejnych podrozdziałach Wstępu doktorantka przedstawia najpierw ogólną charakterystykę receptorów α_1 -adrenergicznych, regulację ich ekspresji i funkcji oraz rolę w wybranych układach (sercowo-naczyniowym i ośrodkowym układzie nerwowym).

Kolejny podrozdział doktorantka poświęca drobiazgowemu omówieniu leków przeciwdepresyjnych (LPD), z podziałem na grupy i omówieniem mechanizmów działania. W końcowej części wstępu doktorantka zaznacza rolę pierwiastków w farmakoterapii depresji. Na uwagę zasługuje podrozdział opisujący zmiany adaptacyjne w wyniku wielokrotnego stosowania leków. Wstęp kończy omówienie kierunków poszukiwań nowych strategii farmakologicznych. Omawiany rozdział w przystępny sposób wprowadza w tematykę badań przedstawionych w rozprawie. Zrozumienie przedstawionych informacji ułatwiają załączone ryciny (5 rycin). Dane tego rozdziału stanowią mocny punkt odniesienia dla uzasadnienia celowości przeprowadzonych badań.

Kolejny rozdział opisuje **Cele pracy**. Motyw przewodni rozprawy to określenie zróżnicowania podtypów receptorów α_1 -adrenergicznych w efektach indukowanych przez LPD. Cele cząstkowe doktorantka wyłożyła przekonująco. Sekwencje podjętych zadań cechuje logika pogłębiania wiedzy. Jest to po mistrzowsku skonstruowany program „po nitce do kłębka”, realizowany w oparciu o badania przeprowadzone w genetycznych modelach *in vitro* i *in vivo*.

Materiały i Metody Doktorantka wykorzystwała sparаметryzowane modele doświadczalne - linie komórkowe ze stabilną ekspresją pojedynczego podtypu receptora oraz mysią linię transgeniczną z selektywnym unieczynnieniem genów kodujących podtypy α_1 receptorów adrenergicznych (α_1 -AR). Rozprawa oparta jest na solidnych podstawach metodycznych opisanych poprawnie i wyczerpująco. Autorka posługuje się adekwatnym arsenalem metod biochemicznych takich jak autoradiografia, chromatografia cieczowa, qRT-PCR, absorpcyjna spektrometria, WB. Ten obszerny katalog świadczy o wszechstronności

warsztatowej doktorantki a wysoki standard techniczny prowadzonych badań wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Kolejna część, **Wyniki**, odzwierciedla szeroki zakres prowadzonych badań. Doświadczeniami objęto wszystkie zaanonsowane parametry. Uzyskane dane są opisane na 45 stronach, zilustrowane rycinami (18), i czytelnymi tabelami opatrzonymi dokładnymi opisami. Wyniki są mocną stroną rozprawy.

Niezwykle istotnym punktem wyjściowym jest skrupulatna analiza linii komórkowych ze stabilną ekspresją badanych podtypów receptorów alfa₁-adrenergicznych (alfa_{1A}-AR, alfa_{1B}-AR, alfa_{1D}-AR) w celu sprawdzenia ich przydatności do dalszych badań farmakologicznych. Oznaczone parametry analizy saturacyjnej, aktywność metaboliczna komórek i funkcjonalność podtypów alfa₁-AR wykazały, że stabilna ekspresja nie powinna wpływać na wyniki dalszych oznaczeń i linie te mogą być wykorzystane do zaplanowanych badań farmakologicznych. Należy zaznaczyć, że doktorantka ustaliła jeszcze kolejność LPD w zależności od hamującego wpływu na poziom aktywacji poszczególnych podtypów w odpowiedzi na stymulację noradrenaliną (tabela 4.5). Zanotowała, że podane leki przeciwdepresyjne mogą modulować funkcje alfa₁-AR w sposób złożony i zależny od podtypu receptora. Przykładem jest istotna rola podtypy alfa_{1B} w działaniu IMI i DMI oraz podtypów alfa_{1A} i alfa_{1B} w działaniu CIT.

Kolejny etap realizacji celu pracy to badania prowadzone w układzie *in vivo* na liniach transgenicznych opisanych w poprzednim rozdziale. Przeprowadzona na wstępie charakterystyka modelu opisana precyzyjnie w treści rozprawy, wskazuje na celowość wykorzystanie do badań. W następnej części pracy doświadczalnej doktorantka dąży do określenia udziału typów receptorów alfa₁-adrenergicznych w efektach dwóch wybranych leków przeciwdepresyjnych – DMI i MI, uzasadniając jasno przyczynę wprowadzonego ograniczenia. Podstawowym zadaniem była ocena wpływu delecji podtypów receptorów alfa₁-adrenergicznych (A-KO, B-KO, D-KO) na efekty wielokrotnego podawania wybranych leków. Punktem wyjściowym było oznaczenie ekspresji mRNA poszczególnych podtypów w korze przedczołowej samców. Ważną obserwacją poczynioną przez doktorantkę jest fakt, że unieczynnienie receptora alfa₁-AR modulować może efekty działania leków w sposób zależny od podtypu. Selektywne unieczynnienie receptora alfa_{1D}-AR prowadziło do istotnego wzrostu ekspresji mRNA genu kodującego podtyp alfa_{1A}-AR. Na tej podstawie autorka pracy stawia odważną hipotezę, sugerującą kompensację funkcji podtypu 1D przez

alfa_{1A}-RA. Bardzo interesującym spostrzeżeniem świadczącym o roli podtypu alfa_{1D}-AR jest fakt że jego unieczynnienie znosi efekty działania MIL. Można wnioskować, że uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę podtypu alfa_{1D} w transmisji noradrenergicznej. Celowym, dla pełnego obrazu, byłoby przeprowadzenie odnośnych badań na płci przeciwnej, jak to ma miejsce w dalszej części rozprawy.

Prezentowana rozprawa doktorska kończy oceną wpływu delecji podtypów i leków przeciwdepresyjnych na ekspresję wybranych białek sygnałowych oraz poziomy wybranych pierwiastków: Ca, Zn, Cu i Ca. Nie chcąc wracać do szczegółowego opisu wyników zawartego w rozprawie odniosę się jedynie do wybranych aspektów. Tę część oznaczeń doktorantka wykonała u samców i samic myszy, zgodnie z opublikowanymi danymi wskazującymi na międzypłciowe różnice odpowiedzi w zaburzeniach psychicznych jak i w chorobach neurodegeneracyjnych. Na podstawie wykonanych oznaczeń doktorantka stwierdziła różnice profilu zmian aktywności badanych białek w zależności od unieczynnionego podtypu receptora. Podczas gdy u samców myszy D-KO w przeważającej części wyników obserwowano wpływ mutacji na efekty działania MIL, u samic wpływ mutacji odnotowano głównie w przypadku DMI. Zgadzam się z doktorantką że obserwowane efekty wypływają z aktywności różnych ścieżek przekazywania sygnału.

Na zakończeniu tego rozdziału chciałabym podkreślić, że opisane dane są jednoznaczne i nie budzą zastrzeżeń. Autorka poczyniła szereg oryginalnych obserwacji o istotnym znaczeniu poznawczym i być może odległych implikacjach klinicznych. Merytorycznie praca nie zawiera widocznych usterek. Doceniając walory rozprawy doktorskiej pani mgr Katarzyny Chorążkiej nie mogę się powstrzymać od wypunktowania pewnych uwag dotyczących przygotowanej dokumentacji:

- ad. Ryc, 4.12 – zgodnie z wykresem 4.12 A unieczynnienie receptora alfa₁-AR nie zmienia poziomu noradrenaliny jak i 5HT względem WT. Opis umieszczony pod ryciną wskazuje, że przedstawione dane były uzyskane metoda jednoczynnikowej analizy wariancji (?) i testem post-hoc Tukeya. Natomiast na str 86 doktorantka mówi o istniejącym wpływie delecji alfa_{1A}-AR na poziom NA i HT na podstawie analizy otrzymanych wyników, odwołując się do tejże Ryc.4.12, która takich zmian nie obrazuje. Według jakiej analizy odnotowano zatem różnice wpływu delecji?

- ad ryc.4.15. Opis zamieszczony na stronach 91 i 92 nie jest jednoznaczny. Chciałam zaznaczyć, że ta kwestia została wyjaśniona z doktorantką w toku dyskusji

- nie mogę zrozumieć, dlaczego przygotowane schematy mają małe rozmiary. Nie mówiąc już o odczytaniu analizy ontologicznej. Odczyt malutkich czcionek wymaga, szczególnie wieczorem, wzmożonej koncentracji wzrokowej

Kończącym rozdziałem rozprawy jest **DYSKUSJA i WNIOSKI**

Dyskusja (licząca 14 stron) napisana jest adekwatnie do otrzymanych wyników.

Doskonałym zabiegiem było zamieszczenie we wstępnej części dyskusji tabeli podsumowującej przebieg zmian w eksperymentach oceniających efekty leków przeciwdepresyjnych na poszczególne podtypy alfa₁-AR. Dane te stanowią ułatwienie dla recenzenta. Opisany rozdział rozprawy doktorskiej Pani Mgr Katarzyny Chorążkiej charakteryzuje się logiką wyводу w zakresie uzyskanego materiału. Doktorantka prowadzi kompetentną dyskusję wokół otrzymanych danych i dokonuje konfrontacji badań własnych z cytowanymi publikacjami, unikając przy tym zbędnych spekulacji.

Dyskusja wskazuje na b. dobre przygotowanie i świetną orientację w temacie przygotowanej rozprawy.

WNIOSKI przedstawione w rozprawie doktorskiej pani mgr katarzyny Chorążkiej korespondują z celem pracy i stanowią podsumowanie oryginalnych obserwacji autorki.

Rozprawa pani mgr Katarzyny Chorążkiej napisana jest starannie, komunikatywnym poprawnym językiem, a formułowane w niej sądy wyrażone są jasno i przekonująco. Całość czyta się łatwo i z przyjemnością.

Moja ocena rozprawy doktorskiej pani mgr Katarzyny Chorążkiej p.t. „Analiza funkcjonalnego zróżnicowania podtypów receptorów alfa₁-adrenergicznych w efektach leków przeciwdepresyjnych: badania w genetycznych modelach *in vitro* i *in vivo*” jest bardzo wysoka. Świetnie przygotowana, systematyczna i nasycona nową rozprawa, oparta na dobrze sparametryzowanych modelach doświadczalnych, ujawniła walory osobowości naukowej kandydatki.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. 2022, poz. 574 z późn. zm.)

Przeto z pełnym przekonaniem przedkładam Radzie Naukowej wniosek o dopuszczenie Pani Mgr Katarzyny Chorążkiej 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 (t.j.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.)]

Stawiam również skierowany do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk PAN formalny wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr Katarzyny Chorążkiej pt. „Analiza funkcjonalnego zróżnicowania podtypów receptorów α_1 -adrenergicznych w efektach leków przeciwdepresyjnych: badania w genetycznych modelach *in vitro* i *in vivo*.

Na niewątpliwy sukces rozprawy składa się zarówno trafny wybór tematu, przekonywujące przedstawienie założeń pracy, profesjonalne wykonanie badań, wzorowe opisanie wyników, umiejętność stawiania śmiałych hipotez i oparta na doskonałej znajomości literatury dyskusja oraz trafnie ujęte wnioski.

Warszawa, 15.12.2022

