

Dr hab. n. med. Bernadeta Szewczyk

Zakład Neurobiologii

Krakow, 06-09-2021 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej **Pani mgr Eweliny Kondzielnik**, doktorantki Zakładu Radioligandów Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie

pt. „**Zmiany adaptacyjne receptorów mGluR5 wywołane lekami przeciwdepresyjnymi**”

Pomimo dostępności wielu leków przeciwdepresyjnych wyniki leczenia depresji nadal nie są zadowalające. Jedną z przyczyn braku skuteczności stosowanej farmakoterapii jest wciąż nie do końca poznany patomechanizm tej choroby. Z drugiej strony jak pokazują wyniki badań, również mechanizm działania leków przeciwdepresyjnych nie jest w pełni opisany.

Celem przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej było poszerzenie wiedzy na temat roli receptorów glutaminianergiczných w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych z uwzględnieniem roli interakcji pomiędzy receptorami jonotropowymi i metabotropowymi, białkami szlaków sygnalizacyjnych związanych z receptorami glutaminianergicznymi czy też interakcji z białkami rusztowania komórkowego. Biorąc pod uwagę opublikowane dane z literatury przedmiotu, wybór celu rozprawy jest jak najbardziej uzasadniony.

Przedstawiona do oceny rozprawa posiada klasyczny układ edytorski: Streszczenie w języku polskim; Streszczenie w języku angielskim; Wykaz najważniejszych skrótów; Wstęp; Cel pracy; Materiały i metodyka badań; Wyniki; Dyskusja; Podsumowanie; Wnioski; Spis tabel; Spis rycin; Bibliografia co daje całościowo 174 strony. W rozprawie zawarty jest 100 rycin, 29 tabel i odnośniki do 294 pozycji literaturowych. Praca została przygotowana bardzo starannie. Warto również zwrócić uwagę na bogactwo ilustracji, które w sposób przejrzysty przedstawiają omawiane treści merytoryczne.

Biorąc pod uwagę fakt, iż szczegółowe informacje i dane zawarte w rozprawie zostaną przedstawione przez Doktorantkę w czasie obrony w mojej recenzji ograniczę się do pozytywnych oraz negatywnych uwag.

Pozytywnie oceniam rozdział stanowiący wstęp do rozprawy, w którym Doktorantka przedstawiła szczegółowe informacje dotyczące depresji w tym jej rozpowszechnienia w populacji, omówiła kryteria diagnostyczne oraz główne hipotezy wyjaśniające mechanizmy leżące u podłoża występowania depresji. Znaczna część wstępu poświęcona została omówieniu budowy i funkcji układu glutaminianergicznego. Doktorantka omówiła szczegółowo budowę i funkcje receptorów dla glutaminianu, ich rozmieszczenie, omówiła właściwości związków modulujących funkcję zarówno receptorów jonotropowych jak i metabotropowych. W kolejnych podrozdziałach omówiła rolę układu glutaminianergicznego w patofizjologii zaburzeń afektywnych oraz mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych. Wstęp jest merytoryczny i świadczy, że Doktorantka posiada bardzo dużą wiedzę teoretyczną z zakresu omawianej tematyki. Drobne uwagi dotyczące tego



rozdziału rozprawy: i) we wstępie pojawił się rozdział poświęcony zaburzeniom okołodobowym i ich roli w patofizjologii depresji co nie do końca wpisuje się w zagadnienia rozprawy, ii) podrozdział poświęcony zmianom neuroplastyczności w kontekście etiologii depresji i działania leków przeciwdepresyjnych został opisany zbyt ogólnikowo, iii) brakuje podrozdziału poświęconego omówieniu głównych grup stosowanych obecnie leków przeciwdepresyjnych oraz podstawowych mechanizmów ich działania, zwłaszcza, że to leki przeciwdepresyjne są podstawowym narzędziem wykorzystanym w pracy doktorskiej.

W swojej rozprawie, jak już było wspomniane powyżej, Doktorantka skupiła się na wyjaśnieniu roli receptorów glutaminianergicznych zwłaszcza receptorów metabotropowych - mGluR5 w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych. Poza określeniem dynamiki zmian poziomu receptorów mGluR5 pod wpływem leków przeciwdepresyjnych, Doktorantka opisała zmiany poziomu ekspresji wybranych podjednostek receptora NMDA (GluN2B), receptora AMPA (GluA1), zmiany ekspresji białek synaptycznych (synapsyny I, CaMK2, mTOR oraz BDNF) oraz białek funkcyjnych w tym białek gęstości synaptycznej (PSD95, Homer 1a i SHANK3). Jako modelowe leki przeciwdepresyjne Doktorantka wybrała imipraminę, reboksetynę i S-citalopram. Jako leki kontrolne zastosowała lek przeciwpsychotyczny (haloperidol) oraz enancjomer citalopramu związek R-citalopram. W celu określenia dynamiki zmian, leki podawane były jednorazowo lub chronicznie przez 7, 14 i 21 dni a do oznaczenia zmian w poziomie ekspresji białek Doktorantka zastosowała metodę Western blot. Wybrana metoda badawcza jest adekwatna do założonego celu. Z opisu wynika iż Doktorantka w pełni opanowała warsztat badawczy i nie ma wątpliwości, że eksperymenty zostały wykonane prawidłowo.

Otrzymane wyniki zostały przedstawione w formie wykresów i do każdego z nich dołączono przykładowe western bloty z uwzględnieniem masy molekularnej badanych białek. Każdy wykres został opatrzony legendą uwzględniającą m.in. informacje na temat wykonanej analizy statystycznej jak również badanych struktur mózgowych oraz ilości próbek wykorzystanych do analizy. Wykresy są przejrzyste i przygotowane prawidłowo. Na zakończenie rozdziału IV (Wyniki) Doktorantka przedstawiła zbiorcze zestawienie wyników w odniesieniu do struktury mózgu, czasu stosowania leków oraz zastosowanego leku co znacznie ułatwia analizę przedstawianych danych. Uwaga do tego rozdziału: w tabelach od 25-29 zostały przedstawione wyniki w odniesieniu do zastosowanego leku ale w legendzie do tabel pojawiły się drobne błędy. Przykładowo z tabeli 20 czy 22 wynika, iż po 7 dniach podawania haloperidolu znamiennie wzrasta poziom białka mGluR5 w hipokampie natomiast z tabeli 29 wynika, że poziom tego białka spada. Podobny błąd dotyczy wyniku dotyczącego poziomu białka GluA1 (7 dni podań). W opisie pojawiają się również błędy w odniesieniu do istotności zaobserwowanych zmian.

Pozytywnie oceniam rozdział poświęcony dyskusji uzyskanych danych. Dyskusja jest zwięzła i bardzo merytoryczna co świadczy o dużej wiedzy doktorantki i umiejętnościach analitycznych. Doktorantka umiejętnie skonfrontowała własne osiągnięcia z danymi w literaturze przedmiotu. Nie brak również krytycznych uwag ze strony samej Doktorantki dotyczących słabych punktów pracy co dodatkowo podnosi wartość dyskusji. Uwaga, która nasunęła się w trakcie recenzji:



i) w ostatnim akapicie pierwszego podrozdziału dyskusji Doktorantka przedstawiła po raz kolejny cel pracy ale uzupełniony o merytoryczne przesłanki dlaczego wybrano konkretne leki przeciwdepresyjne oraz informacje w jakich strukturach mózgu zostały wykonane oznaczenia i dlaczego wybrano do badań metodę Western blot. Ten fragment w całości powinien znaleźć się w opisie celu pracy (II rozdział, str. 43); ii) w dyskusji brakuje końcowego przesłania (konkluzji) czy otrzymane wyniki oprócz poszerzenia wiedzy na temat mechanizmu działania leków, mogą pomóc w poszukiwaniu nowej, skuteczniejszej farmakoterapii depresji.

Uwagi ogólne: i) w tekście pojawiają się nieaktualne już jak i nowe nomenklatury podjednostek receptorów jonotropowych; ii) w rozdziale materiały i metodyka badań wspomniano iż w każdej grupie było po 8 osobników a w legendzie do figur pojawia się informacja o n=6-8;

Podsumowując, pragnę podkreślić, iż przedstawione w opisie poszczególnych rozdziałów uwagi nie wpływają na pozytywną ocenę pracy. Otrzymane wyniki wskazują, że modulacja funkcji receptora NMDA, aktywacja szlaku kinazy mTOR, synteza białek, takich jak BDNF, synapsyna I, GluA1 które są zaangażowane w synaptogenezę oraz plastyczność synaptyczną stanowią istotny i specyficzny mechanizm działania leków przeciwdepresyjnych. Jednocześnie, uzyskane dane sugerują, iż receptor mGluR5 może być zaangażowany w mechanizm działania leków przeciwdepresyjnych jak i leków przeciwpsychotycznych. Zamierzony cel pracy, został zrealizowany a otrzymane wyniki zgodnie z założeniem poszerzyły wiedzę na temat mechanizmów działania leków przeciwdepresyjnych i mogą stanowić istotną wskazówkę w badaniach nad poszukiwaniem nowych substancji o potencjale przeciwdepresyjnym.

W mojej opinii rozprawa doktorska zatytułowana „Zmiany adaptacyjne receptorów mGluR5 wywołane lekami przeciwdepresyjnymi” w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim, dlatego przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ wniosek o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Kondzielnik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Zakładu Neurobiologii
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk


Dr hab. Bernadeta Szewczyk