



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

Katedra i Zakład Toksykologii  
Laboratorium Badań Środowiskowych

ul. Dojazd 30  
60-631 Poznań  
e-mail: eflorek@ump.edu.pl

tel. 61 847 20 81  
faks 61 847 20 81 w. 157

Prof. dr hab. Ewa Florek  
Kierownik  
Laboratorium Badań Środowiskowych  
Katedry i Zakładu Toksykologii  
Uniwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu

Poznań, 20 sierpnia 2018 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej

***pt. „Badania markerów aktywności układu glutaminianergicznego  
w przedklinicznej analizie podatności na uzależnienia od substancji  
psychostymulujących”***

**Pani mgr Ewy Niedzielskiej-Andres wykonanej w Katedrze Toksykologii na  
Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium  
Medicum w Krakowie**

Najczęściej używaną nielegalną substancją psychoaktywną w Europie jest m.in. kokaina. Uzależnienie od tych substancji psychoaktywnych jest przewlekłą chorobą ośrodkowego układu nerwowego. Niestety skala stosowania takich substancji zwiększa się i staje się bardziej widoczna w niektórych środowiskach i grupach społecznych, stąd zjawisko to w dalszym ciągu stanowi znaczne wyzwanie dla zdrowia publicznego. Na podstawie danych z piśmiennictwa w odniesieniu do rozwoju uzależnienia od kokainy jedynie co piąta osoba nadużywająca tę substancję uzależnia się. Osoba ta reprezentuje tzw. fenotyp na rozwój uzależnienia, którego podłoże neurobiologiczne nie zostało dotąd poznane. Efekty działania kokainy w początkowej fazie zależne są od aktywacji układu dopaminowego, natomiast wiele

badania dowodzi się, że za rozwój uzależnienia z zachowaniem poszukiwawczym i nawrotowością odpowiadają adaptacje w obrębie układu glutaminianergicznego. Zmiany w obrębie tego układu mogą przyczyniać się do rozwoju uzależnienia u osób podatnych, natomiast u osób opornych takie zmiany nie występują pomimo podawania kokainy.

Przedmiotem recenzowanej pracy doktorskiej było wyjaśnienie roli wybranych elementów układu glutaminianergicznego w podatności na rozwój uzależnienia od kokainy. Podjęcie zaproponowanej tematyki badawczej przez Doktorantkę wydaje się być uzasadnione nie tylko ze względu na chęć wykazania zależności między ujawnieniem się cech fenotypu narkomana, w tym wypadku wystąpienia objawów uzależnienia u zwierząt doświadczalnych poddanych działaniu kokainy lub brakiem pojawienia się takiego fenotypu mimo podawania substancji uzależniającej a zmianami w obrębie ekspresji białek wybranych elementów układu glutaminianergicznego, ale i z możliwych korzyści społecznych. Autorka podjęła próbę wyjaśnienia neuromolekularnego mechanizmu powyższych zmian na poziomie transkrypcyjnym i ustalenia czy antybiotyk ceftriakson zmienia indukowane kokainą efekty behawioralne i neuromolekularne u zwierząt podatnych na uzależnienie. Uważam, że temat podjętej rozprawy doktorskiej jest nowatorski, a pracę należy uznać za oryginalną.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania realizowane przez Doktorantkę były finansowane w ramach grantu badawczego z Narodowego Centrum Nauki w Krakowie, a także z badań statutowych z Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum i Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Świadczy to, że nie tylko recenzent podkreśla istotność tematu, ale i najważniejsze, krajowe instytucje finansujące badania oraz Uczelnia i Instytut promują nowatorską tematykę.

Rozprawa liczy 141 stron, zawiera 8 tabel i 47 rycin. Układ pracy jest przejrzysty. Praca podzielona jest na dziesięć rozdziałów, w tym *Piśmiennictwo* oraz *Streszczenie* w języku polskim i angielskim. Autorka na wstępie zamieściła *Wykaz zastosowanych skrótów*, a w końcowej części *Spis tabel i rysunków*. Brakuje jedynie tytułu w języku angielskim oraz słów kluczowych w języku polskim i angielskim, które mają przybliżyć treść pracy i są używane do automatycznego wyszukiwania prac w bazach danych.

Układ dysertacji jest typowy, *Wstęp* obejmujący część teoretyczną wprowadzającą czytelnika w temat, zaprezentowano *Cel pracy*, sposób jego osiągnięcia (*Materiał i metody badawcze*), uzyskane *Wyniki*, ich *Dyskusję* oraz *Wnioski*. Praca zawiera wszystkie wymagane elementy stawiane takim opracowaniom. Dysertacja doktorska jest napisana zwięzłym i poprawnym językiem z zastosowaniem prawidłowej nomenklatury.

Wybór tematu został bardzo dobrze uzasadniony we *Wstępie* wprowadzając tym samym czytelnika w tematykę rozprawy. Doktorantka zaprezentowała aktualny stan wiedzy na temat charakterystyki uzależnienia od substancji psychoaktywnych, kokainy, układu nagrody, zwierzęcych modeli uzależnień, układu glutaminianergicznego i podatności na uzależnienie od kokainy w oparciu o najnowsze piśmiennictwo anglojęzyczne. Bardzo istotną częścią *Wstępu* jest omówienie zwierzęcych modeli uzależnień należących do jednych z trudniejszych metodyk badawczych w układzie eksperymentalnym. W tym miejscu należy pochwalić Doktorantkę nie tylko za logiczny układ tej części pracy, ale i wyczerpujące udokumentowanie przedstawianych informacji. Wysoko oceniam umiejętność mgr Ewy Niedzielskiej-Andres korzystania z aktualnego piśmiennictwa, które cytowane jest zgodnie z wymogami.

Zaprezentowane dane z piśmiennictwa stanowią dobrze opracowaną podstawę teoretyczną do sformułowania celu dysertacji i wyboru metod badawczych dla jego realizacji. Świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym i metodologicznym Autorki.

Istotne znaczenie w realizacji tematu miał dobór modelu badań behawioralnych - CPP – Warunkowa Preferencja Miejsca. Ten wybór był podyktowany koniecznością podziału zwierząt na te wykazujące fenotyp podatny i te wykazujące fenotyp oporny na nagradzające działanie kokainy.

Do osiągnięcia zamierzonego celu Autorka uznała za niezbędne: 1. Wykazanie zależności między ujawnieniem się cech fenotypu narkomana – w układzie eksperymentalnym, 2. Próbę wyjaśnienia neuromolekularnego mechanizmu zmian na poziomie transkrypcyjnym i 3. Ustalenie, czy antybiotyk ceftriakson zmienia indukowane kokainą efekty behawioralne i neuromolekularne u zwierząt podatnych na uzależnienie.

Opis części badawczej rozpoczyna rozdział *Materiał i metody*, w którym podano niezbędne informacje dotyczące: 1. Zwierząt doświadczalnych, 2. Podawanych substancji oraz 3. Badań behawioralnych. Całość tej części metodyki została podsumowana w postaci schematu eksperymentu, który pozwala na szybki wgląd w procedury badawcze. Dalsza część rozdziału to starannie opisane analizy neurochemiczne, od izolacji tkanek, poprzez oznaczenia ekspresji białka metodą Western Blot, kończąc na ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Metodykę zamyka podrozdział obliczenia statystyczne, w którym mgr Niedzielska-Andres zaprezentowała testy, które wykorzystwała do oceny wyników eksperymentów. Pomiary zostały zaplanowane w sposób prawidłowy i poprawnie przeprowadzone.

Rozdział opisujący *Wyniki* rozpoczyna się od przedstawienia zmian poziomów wybranych markerów aktywności układu glutaminianergicznego w zwierzęcym modelu uzależnienia u osobników wykazujących fenotyp podatny lub oporny na rozwój uzależnienia. Doktorantka z niezwykłą dokładnością i rzetelnością omówiła wyniki badań behawioralnych i zaprezentowała ocenę zdolności hamowania nawrotu CPP indukowanej kokainą przez ceftriakson oraz jego wpływ na poziom wybranych markerów aktywności układu glutaminianergicznego. Całość została szeroko zilustrowana 38 rycinami, co pozwala czytelnikowi na szybki wgląd w najważniejsze dane. Podstawą interpretacji tak dużej liczby wyników była prawidłowo przeprowadzona analiza statystyczna.

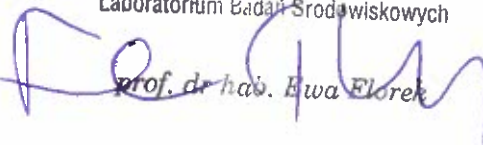
Bardzo dobrze oceniam umiejętność przejrzystego podsumowania i interpretacji wyników badań. Autorka rzeczowo przeprowadziła *Dyskusję* (28 stron) własnych wyników badań na tle aktualnego piśmiennictwa wykorzystanego w sposób celowy i właściwy. Dyskusja jest najbardziej dowolną i najbardziej autorską częścią pracy, oceniam ją doskonale.

Badania zostały podsumowane pięcioma wnioskami uzyskanymi z wyników i uogólnieniami z przeprowadzonej dyskusji.

Merytoryczną wartość rozprawy doktorskiej mgr Ewy Niedzielskiej-Andres oceniam bardzo wysoko. Niewątpliwym osiągnięciem Autorki są wyniki badań wykazujące istnienie różnic na poziomie behawioralnym w odpowiedzi na podawanie kokainy wśród zwierząt laboratoryjnych, które ujawniało się w postaci fenotypu podatnego i fenotypu opornego na rozwój uzależnienia od kokainy. Każdemu rodzajowi fenotypu towarzyszyły charakterystyczne zmiany molekularne w obrębie badanych białek w odpowiedniej fazie testu behawioralnego. Doktorantka wykazała, że zastosowany lek – ceftriakson zmniejszył indukowany środowiskiem nawrót do warunkowanej preferencji miejsca wywołanej kokainą, a efekt ten był związany z zapobieganiem spadkowi ekspresji GLT-1 w NAc przez ceftriakson. Na podkreślenie zasługuje fakt, że mgr Niedzielska-Andres po raz pierwszy wykazała, że ceftriakson wpływa w sposób szerszy na homeostazę układu glutaminianergicznego niż jedynie poprzez wpływ na transportery GLT-1, czy xCT w NAc. Zmiany neuroplastyczne w obrębie układu glutaminianergicznego w szlakach zaangażowanych w rozwój uzależnienia zostały uznane za główne procesy będące podłożem zachowań charakterystycznych dla uzależnienia. Tym samym praca mgr Ewy Niedzielskiej-Andres pozwalająca na poznanie i zrozumienie procesów komórkowych przyczyniających się do tych zmian neuroplastycznych w obrębie układu glutaminianergicznego jest niezwykle ważna, a próba farmakologicznego odwrócenia powyższych zmian może przyczynić się do poprawy patologicznych zachowań i stać się elementem proponowanych, nowych strategii terapeutycznych w walce z uzależnieniem. Treść pracy została starannie wyselekcjonowana. Układ rozprawy jest przejrzysty, a dyskusja rzeczowa. Wykazanie pewnych luk na obecnym poziomie wiedzy tłumaczy celowość podjętych badań, a tym samym podnosi wartość zaprezentowanych wyników.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, stronę merytoryczną oceniam bardzo dobrze. Praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wyczerpuje to wymagania określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum w Krakowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Ewy Niedzielskiej-Andres do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wobec wysokiego poziomu badań posiadających szczególne walory poznawcze, a także oryginalności zastosowanych narzędzi i metod badawczych przedstawiam w osobnym dokumencie wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK  
Laboratorium Badań Środowiskowych  
  
prof. dr hab. Ewa Flórek