

**Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES**

Instytut Ekspertyz Sądowych

im. prof. dra Jana Sehna

w Krakowie

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Ewy Niedzielskiej-Andres pt.  
*Badania markerów aktywności układu glutaminianergicznego w przedklinicznej analizie  
podatności na uzależnienia od substancji psychostymulujących***

**Charakterystyka i znaczenie podjętej problematyki badawczej**

Rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Niedzielskiej-Andres została poświęcona problematyce uzależnienia od środków psychoaktywnych, w szczególności analizie zmian neurobiologicznych zachodzących w okresie abstynencji od ich stosowania.

Uzależnienie od substancji psychoaktywnych jest przewlekłą chorobą ośrodkowego układu nerwowego, którą charakteryzuje silna motywacja do ich przyjmowania, działania poszukiwawcze oraz niekontrolowane stosowanie mimo negatywnych konsekwencji używania. Badania nad przyczynami rozwoju uzależnienia są bardzo istotne, ponieważ z roku na rok rośnie liczba osób przyjmujących substancji psychoaktywne i w konsekwencji wzrasta liczba osób uzależnionych od tego typu środków. Jednocześnie wiedza na temat czynników wpływających na powstanie i nasilenie uzależnienia jest ograniczona. Znajomość procesów zachodzących wówczas w organizmie człowieka może pozwolić na przeciwdziałanie tym procesom. Ponadto, poznanie mechanizmów działania na ośrodkowy układ nerwowy może umożliwić opracowanie leków, które będą przeciwdziałać powrotowi do przyjmowania środków psychoaktywnych.

Dane epidemiologiczne wskazują, że jedynie część osób, które rozpoczęły przyjmowanie substancji psychoaktywnych uzależnia się od nich. Tą część populacji określa się jako fenotyp podatny, w przeciwieństwie do osób, które mimo przyjmowania substancji psychoaktywnych nie uzależniają się; określa się ich jako fenotyp odporny. Poznanie jakie czynniki sprawiają, że osoba przyjmująca pozostaje przy rekreacyjnym zażywaniu środków psychoaktywnych i nie rozwija się u nich uzależnienie, podczas gdy u innych dochodzi do rozwoju tej choroby było jednym z celów recenzowanej pracy. Kluczowe jest ustalenie co sprawia, że osoby podatne przechodzą od sporadycznego do kompulsywnego, niekontrolowanego przyjmowania określonego środka. Decyzja o rozpoczęciu przyjmowania środków psychoaktywnych jest bowiem w przypadku większości osób dobrowolna, ale wielokrotne stosowanie takich środków może prowadzić do powstawania zmian w mózgu, które zaburzają zdolność samokontroli i powodują przymus ich zażywania.

Zdolność substancji do wywołania uzależnienia jest silnie zależna od jej rodzaju. Doktorantka do badań wybrała kokainę – silny środek o działaniu psychostymulującym. Zgodnie z bieżącym raportem Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii (EMCDDA), kokaina jest najpopularniejszym psychostymulantem używanym w Europie Zachodniej i jej popularność rośnie z roku na rok. W Polsce środek ten jest mniej popularny niż np. amfetamina, ale również zauważa się w ostatnich latach wzrost popularności kokainy, zwłaszcza w dużych aglomeracjach miejskich.

Kokaina jest substancją powodującą pobudzenie, dającą poczucie pewności siebie, poprawiającą nastrój, koncentrację oraz wytrzymałość. Mechanizm działania polega głównie na blokowaniu wychwytu zwrotnego dopaminy, noradrenaliny oraz serotoniny, a efekty nagradzające wynikają ze zdolności wpływania na przekąźnictwo dopaminowe w obrębie tzw. układu nagrody. Choć podstawowym neuroprzekąźnikiem tego układu jest dopamina, to w aspekty motywacyjne pobierania kokainy zaangażowane są również układy innych neuroprzekąźników, w tym glutaminianu. Ponieważ wykazano, że w przejściu od nadużywania do niekontrolowanego przyjmowania kokainy prawdopodobnie nie bierze udziału układ dopaminowy, w recenzowanej pracy analizowana była rola glutaminianu w tym zakresie.

Kokaina jest substancją, której właściwości sprawiają, że stosunkowo duży odsetek osób ją przyjmujących się uzależnia. Jednocześnie terapia uzależnienia od tego środka charakteryzuje się niską skutecznością w porównaniu z terapiami uzależnień od innych substancji psychoaktywnych. Te czynniki sprawiają, że kokaina jest jednym ze związków najczęściej wykorzystywanych w badaniach nad rozwojem uzależnienia i opracowano wiele

modeli w tym zakresie. Wiadomo, że za wywołanie uzależnienia i jego nasilenie odpowiada nie tylko sama substancja psychoaktywna, ale również cechy osobowości użytkownika, czynniki genetyczne, środowiskowe czy nawykowe. Ważnym elementem uzależnienia jest powstanie powiązania pomiędzy efektami działania substancji uzależniającej a bodźcami, które zwykle towarzyszą jej stosowaniu. Taka asocjacja efektu działania środka z bodźcami prowadzi do wyuczonych reakcji, które indukują głód narkotykowy i powodują wystąpienie zachowań poszukiwawczych. W wyniku przewlekłego stosowania środka stają się one nawykami, które są procesami patologicznymi. Ich formowaniu towarzyszą zmiany neurobiologiczne, które mogą być trwałe, co sprawia, że uzależnienie od środków psychoaktywnych jest traktowane jako choroba nawrotowa. Z tego względu ważnym źródłem informacji na temat uzależnienia są testy behawioralne z udziałem zwierząt, takie jak m.in. warunkowana preferencja miejsca (*conditioned place preference, CPP*) stosowana przez Autorkę pracy.

Identyfikacja psychobiologicznych czynników sprzyjających przejściu przez poszczególne etapy uzależnienia jest celem wielu badań prowadzonych na całym świecie. Wiadomo, że w wyniku stosowania substancji psychoaktywnych dochodzi do zmian neuroplastycznych w mózgu, w szczególności u osób podatnych na rozwój uzależnienia. U osób odpornych zmiany te nie występują lub są mniej nasilone. Różnice powyższych zmian u osób tworzących fenotyp podatny i odporny jak dotąd nie zostały szczegółowo poznane. Wiadomo jednak, że w wywołanie zmian neuroplastycznych w mózgu może być zaangażowany układ glutaminianergiczny, a kluczową rolę mogą odgrywać zmiany w jego funkcjonowaniu na poziomie neuroprzebieżności, a także ekspresji czy aktywności jego transporterów i receptorów w różnych strukturach mózgu. Dotyczy to również działania kokainy, bowiem wiele badań wskazuje, że za rozwój uzależnienia od tej substancji odpowiadają adaptacje właśnie w obrębie układu glutaminianergicznego. W badaniach przedklinicznych wykazano, że przewlekła ekspozycja zwierząt na kokainę wywołuje zmiany adaptacyjne w tym układzie, takich jak spadek aktywności transporterów GLT-1 i  $x_c$  na astrocytach oraz zmiany ekspresji receptorów mGluR1, mGluR5, mGluR2/3 na neuronach. Analiza zmian w układzie glutaminianergicznym w trakcie rozwoju uzależnienia od kokainy była kluczowym elementem badań recenzowanej pracy doktorskiej.

Celem pracy było bowiem wykazanie zależności między ujawnieniem się cech fenotypu podatnego na rozwój uzależnienia a zmianami w obrębie ekspresji białek wybranych elementów układu glutaminianergicznego, bezpośrednio po zakończeniu pierwszego testu warunkowanej preferencji miejsca indukowanej kokainą oraz po siedmiodniowym

odstawieniu, po którym to okresie ponownie badano preferencję miejsca. Ponadto podjęto próbę wyjaśnienia neuromolekularnego mechanizmu zmian na poziomie transkrypcyjnym, a także ustalenia czy antybiotyk ceftriakson zmienia indukowane kokainą efekty behawioralne i neuromolekularne u zwierząt podatnych na uzależnienie.

### **Układ pracy, struktura podziału treści i poruszane zagadnienia**

Recenzowana rozprawa doktorska przedstawiona jest na 141 kartach, z czego 37 zajmuje wprowadzenie do tematyki badań. Część teoretyczna rozpoczyna się od charakterystyki uzależnienia od środków psychoaktywnych. Następnie omówione zostały cechy kokainy, czyli substancji stosowanej w badaniach, a także mechanizm jej działania. W pracy przedstawiono również budowę układu nagrody i rolę jaką pełni w nim układ dopaminowy. Główną część wstępu teoretycznego poświęcono układowi glutaminianergicznego, jego budowie, a także znaczeniu w rozwoju uzależnienia. Omówiono także główne czynniki wpływające na uzależnienie od kokainy, takie jak cechy osobowości, środowisko, cechy genetyczne, zmiany epigenetyczne oraz neuroplastyczność. Należy stwierdzić, że dobór omawianych tematów jest doskonałym wprowadzeniem do części doświadczalnej i pozwala na poznanie aktualnego stanu wiedzy w zakresie badań nad rozwojem uzależnienia od kokainy. Część teoretyczna stanowi monografię na ten temat i sugerowałbym rozważenie jej oddzielnej publikacji.

Omówienie części doświadczalnej rozpoczyna się od jasnego określenia celu pracy. Następnie opisane zostały materiały i sprzęt laboratoryjny stosowany w badaniach, metodyka badań, po czym przedstawiono i omówiono wyniki dwóch głównych części badań. Pierwsza część poświęcona została analizie zmian poziomów wybranych markerów aktywności układu glutaminianergicznego w zwierzęcym modelu uzależnienia u zwierząt wykazujących fenotyp podatny lub odporny na rozwój uzależnienia. Przedstawiono w nim wyniki badań behawioralnych dotyczących wyselekcjonowania zwierząt wykazujących określony fenotyp na rozwój CPP indukowanej kokainą oraz oceny utrzymania się CPP indukowanej kokainą po siedmiu dniach odstawienia zwierząt w klatce bytowej. Ponadto omówiono wyniki badań dotyczących ekspresji wybranych markerów układu glutaminianergicznego na poziomie białka oraz na poziomie mRNA u zwierząt o obu omawianych fenotypach. Druga część badań dotyczyła oceny zdolności hamowania nawrotu CPP indukowanej kokainą przez ceftriakson oraz jego wpływu na poziom wybranych markerów aktywności układu glutaminianergicznego.

Otrzymane wyniki szeroko i dogłębnie przedyskutowano w odniesieniu do wyników badań innych autorów. Autorka pracy wykazała się dużą dociekliwością, starając się uzasadnić wszelkie różnice w uzyskanych wynikach. Dyskusja przedstawiona została aż na 20 stronach pracy, którą kończy podsumowanie i wnioski.

W pracy znajduje się ponad 250 odnośników literaturowych, co świadczy o szerokim rozeznaniu tematyki badawczej przez Doktorantkę. Dobór pozycji literaturowych jest odpowiedni do poruszanej tematyki i jak podałem wcześniej praca jest doskonałym przeglądem aktualnego stanu wiedzy w omawianym zakresie.

Praca napisana jest w sposób bardzo staranny. Należy podkreślić dbałość Doktorantki o formę graficzną pracy oraz stosowane słownictwo. Autorka rozprawy posługuje się poprawną polszczyzną, swobodnie operując nią w złożonej tematyce naukowej. Dzięki temu pracę czytało się z przyjemnością i zainteresowaniem.

### **Ocena metod badawczych, sposobu przeprowadzenia badań i analizy uzyskanych wyników**

Recenzowana praca miała charakter eksperymentalny. W mojej ocenie, badania zostały zaplanowane we właściwy sposób, a dobór narzędzi badawczych, rodzaju eksperymentów oraz aparatury pomiarowej, jak również sposób przeprowadzenia badań oraz analiza uzyskanych wyników były odpowiednie.

Prawidłowe rozróżnienie osobników podatnych na uzależnienie od środka zastosowanego w badaniach od tych o fenotypie odpornym jest podstawą do prawidłowej interpretacji wyników. W pracy wykazano istnienie różnic na poziomie behawioralnym w odpowiedzi na podawanie kokainy wśród zwierząt laboratoryjnych ujawniające się w postaci fenotypu podatnego i fenotypu opornego na rozwój uzależnienia. W przypadku badanej przez Doktorantkę populacji szczurów rasy Wistar udało się uzyskać dwie zdecydowanie zróżnicowane grupy, o znacznej, istotnej statystycznie różnicy czasu przebywania zwierząt w określonych pomieszczeniach (tzw. *CPP score*). Taki dobór grupy badawczej, w połączeniu z zastosowaniem procedury *unbiased*, pozwolił na formułowanie wniosków w sposób dość stanowczy, mimo względnie niedużej grupy badawczej.

W badaniach stosowano dawkę kokainy w postaci chlorowodoru w ilości 15 mg/kg m.c., którą dobrano na podstawie publikacji. Ilość tą należy uznać za właściwą, biorąc pod uwagę dawki przyjmowane jednorazowo przez osoby uzależnione.

Doktorantka poszukiwała różnic w poziomach ekspresji transporterów, czynników transkrypcyjnych czy receptorów między osobnikami o fenotypie podatnym i odpornym. Do statystycznej oceny wyników została użyta jedno- lub dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA), dwuczynnikowa ANOVA pomiarów powtarzanych lub test t-Studenta. W przypadku stwierdzenia statystycznie istotnych różnic między grupami zastosowano test *post hoc* Tukeya lub Bonferroni. Różnice te przyjmowano za istotne statystycznie na poziomie istotności  $p < 0,05$ . Wyniki przedstawiano w pracy na licznych rysunkach, jako średnie dla poszczególnych grup wraz z zaznaczonymi wartościami błędu standardowego średniej. Dobór narzędzi statystycznych przez Doktorantkę należy uznać za właściwy (jednak z uwagą zamieszczoną poniżej).

Ukierunkowanie badań nad uzależnieniem od kokainy na analizę zmian w obrębie układu glutaminianergicznego podczas przewlekłego przyjmowania tego środka należy uznać za właściwe. Początkowe efekty działania kokainy zależą głównie od aktywacji układu dopaminowego, ale za rozwój uzależnienia z zachowaniem poszukiwawczym i nawrotowością odpowiadają adaptacje właśnie w obrębie układu glutaminianergicznego w mózgu. Również wyniki badań przedklinicznych sugerują, że leki przywracające homeostazę tego układu mogą hamować nawrót zachowań poszukiwawczych zwierząt uzależnionych od kokainy.

Analizie zostały poddane wybrane biomarkery aktywności układu glutaminianergicznego w mózgu osobników o fenotypie podatnym i odpornym. Zmiany ekspresji transporterów GLT-1 oraz xCT, a także receptorów mGluR1, mGluR5 i mGluR2/3 były badane na poziomie białka w strukturach kluczowych dla rozwoju uzależnienia takich jak jądro półleżące przegrody, kora przedczołowa, hipokamp oraz prążkowie grzbietowe. Ponadto dokonano pomiarów poziomu odpowiednich mRNA. Oceniono także zmiany ekspresji czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B i Nrf2 zaangażowanych w regulację ekspresji odpowiednio GLT-1 oraz xCT na poziomie białka we frakcji jądrowej oraz na poziomie mRNA. Wszystkie analizy przeprowadzono bezpośrednio po zakończeniu testu CPP oraz po siedmiu dniach odstawienia w klatce bytowej celem oceny trwałości zaobserwowanych zmian. W wyniku badań Doktorantka wykazała, że każdemu rodzajowi fenotypu towarzyszyły charakterystyczne zmiany molekularne w obrębie badanych białek, przy czym zależne one były od fazy testu behawioralnego. Najważniejszą zmianą odróżniającą oba fenotypy w Jej ocenie było istotne

obniżenie ekspresji GLT-1 w jądrze półleżącym przegrody po indukowanym środowiskiem nawrocie CPP wywołanej kokainą u zwierząt o fenotypie podatnym na nagradzające działanie kokainy, czego nie obserwowano u zwierząt o fenotypie opornym. W grupie zwierząt podatnych odnotowano również m.in. spadek ekspresji xCT w hipokampie bezpośrednio po zakończeniu testu CPP, spadek ekspresji mGluR5 w jądrze półleżącym po nawrocie indukowanym środowiskiem po siedmiu dniach odstawienia kokainy, a także spadek poziomu mGluR2/3 w korze przedczołowej w obu fazach eksperymentu. Dzięki analizom mRNA Doktorantka wskazała na zaangażowanie mechanizmów transkrypcyjnych w obserwowane zmiany na poziomie białka, względnie je wykluczyła.

Następnie oceniono zdolność ceftriaksonu do hamowania nawrotu wywołanego kontekstem u zwierząt wykazujących preferencję miejsca indukowaną kokainą. Badania wykonano biorąc pod uwagę zmiany zachodzące w wybranych elementach układu glutaminianergicznego przy podawaniu tego leku. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę wykazały, że wielokrotne podawanie ceftriaksonu w czasie odstawienia kokainy hamowało indukowany środowiskiem nawrót CPP wywołanej kokainą, a efekt ten był związany głównie z zapobieganiem spadkowi ekspresji GLT-1 w jądrze półleżącym u zwierząt.

Recenzowana praca zawiera istotne elementy nowości. Po raz pierwszy dokonano tak szczegółowej analizy zmian neuroplastycznych w obrębie układu glutaminianergicznego w szlakach zaangażowanych w rozwój uzależnienia od środków psychoaktywnych. Za kluczowe osiągnięcie należy uznać wykazanie, że ceftriakson wpływa na homeostazę układu glutaminianergicznego nie tylko poprzez wpływ na transportery GLT-1 czy xCT w jądrze półleżącym, ale wywołuje on również szereg zmian ekspresji transporterów i metabotropowych receptorów glutaminianergicznym w innych badanych strukturach. Poznanie i zrozumienie procesów komórkowych prowadzących do powyższych zmian neuroplastycznych jest bardzo istotne, a zaproponowanie sposobu odwrócenia powyższych zmian poprzez podawanie ceftriaksonu może stać się istotnym elementem farmakoterapii uzależnień od środków psychoaktywnych. Jest to ważne, ponieważ efektywność obecnie stosowanych metod jest niezadowolająca.

## Uwagi szczegółowe

Wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Niedzielskiej-Andres oceniam jako bardzo dobrą. Niezależnie od tej oceny, mam kilka uwag do treści pracy, które przedstawiłem poniżej. Dotyczą one głównie części analitycznej oraz statystycznego opracowania wyników.

1. Temat rozprawy jest w pewnym zakresie mylący, ponieważ sugeruje, że badaniami objęto różne substancje psychoaktywne, podczas gdy zwierzętom podawano jedynie kokainę. Wprawdzie, jak wskazano w pracy, jest prawdopodobne, że układ glutaminianergiczny jest zaangażowany w rozwój uzależnienia od różnych związków, niemniej jednak niniejsza praca zawiera wyniki badań poziomów markerów jedynie po podaniu kokainy. Czy można zatem uzyskane wyniki odnieść również do innych substancji psychoaktywnych?
2. Do detekcji białek zastosowano metodę chemiluminiscencyjną, która charakteryzuje się ograniczonym zakresem liniowości, tj. zależność stężenie białka – sygnał jest liniowa tylko w stosunkowo wąskim zakresie stężeń. Z tego względu Doktorantka dobierała odpowiednio ilość nałożonej próbki wobec każdego przeciwciała. W pracy nie wyjaśniono jednak jak oceniano, kiedy zależność przestawała być liniowa (ulegała wysyceniu, jak to określono w pracy). W opisie rys. 8A podano, że przedstawia on „wyniki przykładowej walidacji przeciwciała”, jednak wbrew temu co napisano w tekście pracy, na podstawie analizy wykresu nie jest możliwe ustalenie kiedy zależność ulega wysyceniu. Jak postępowano gdy wartość sygnału była poza zakresem liniowości metody? Uwagę zwraca, że zależność nie przebiega przez punkt (0,0), co sprawia, że rozcieńczanie może prowadzić do nieprawidłowych wyników.
3. Mam wątpliwości, jak Doktorantka rozumie pojęcie „walidacja”. Zgodnie z definicją z normy PN-EN ISO 9000:2001 walidacja to „potwierdzenie przez dostarczenie dowodu obiektywnego, że zostały spełnione wymagania odnośnie konkretnego użycia lub zastosowania”. W mojej ocenie sformułowania takie jak „walidacja przeciwciała” czy „walidacja rozdziału frakcji” są niewłaściwe, w szczególności ze względu na to, że nie określono jakie wymagania powinny być spełnione.
4. Autorka pracy do porównania wyników dla poszczególnych grup obliczała średnie arytmetyczne oraz błędy standardowe średniej (SEM). Czy stosowano powtórzone pomiary dla poszczególnych próbek (takie działanie sugeruje opis metody statystycznych, gdzie podano, że stosowana była m.in. dwuczynnikowa ANOVA pomiarów powtarzanych,



jednak nie podano szczegółów dotyczących liczby powtórzeń)? W opisie użytych metod nie określono czy weryfikowano normalność rozkładu zmiennych i jednorodność wariancji. Jest to podstawowe założenie przy używaniu analizy wariancji i innych testów stosowanych przez Doktorantkę. Jest to o tyle istotne, że w przedstawionych badaniach grupy badawcze były względnie małe, zatem istniało realne ryzyko braku spełnienia powyższych założeń.

5. Praca, jak oceniałem powyżej, napisana jest bardzo poprawnym językiem. Niemniej można znaleźć w niej anglikanizmy, takie jak np. frakcja nuklearna (str. 48) czy relatywna ekspresja (str. 54), jak też sformułowania uproszczone typu „wyniki przedstawiano jako %kontroli (str. 50)”.
6. Wykaz skrótów mógł zawierać oryginalne nazwy (głównie w języku angielskim) dla wszystkich użytych skrótów, wyjaśniając ich pochodzenie. W pracy podano je jedynie dla wybranych skrótów.

Wskazane powyżej uwagi nie obniżają oceny wartości merytorycznej pracy, która jak podałem powyżej, jest w mojej ocenie bardzo wysoka.

## **Podsumowanie**

Treść rozprawy doktorskiej potwierdza, że Pani mgr Ewa Niedzielska-Andres posiada ogromną wiedzę na temat czynników wpływających na rozwój uzależnienia, bardzo dobry warsztat analityczny, potrafi właściwie zaplanować i przeprowadzić badania oraz zinterpretować uzyskane wyniki. W sposób właściwy odniosła wyniki badań własnych do danych literaturowych. W sposób dociekliwy analizowała uzyskane wyniki i starała się dochodzić do przyczyn niezgodności z wynikami badań innych autorów. Rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Niedzielskiej-Andres zawiera wiele elementów nowości. Rozprawa ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez jej Autorkę.

## **Wnioski**

**Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona wymagania ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595, z późn. zm.) i stawiam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum o dopuszczenie Pani mgr Ewy Niedzielskiej-Andres do publicznej obrony.**



Kraków, dnia 17 września 2018 roku