

Prof. dr hab. n. med. Marek Kowalczyk  
Zakład Farmakologii i Toksykologii  
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii

Warszawa, 25.07.2016r.

**OCENA**  
**Rozprawy doktorskiej mgr Ireny Smaga- Maślanki**  
**p.t. " Rola układu endokannabinoidowego w patogenezie depresji**  
**i w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych"**

Wybór tematu aktualny od wielu lat a ostatnio problemy z depresją wyraźnie się nasilają. Ludzie od tysięcy lat stosują różne substancje chemiczne wpływające na mózg i zachowanie się człowieka w tym również na stany depresyjne. Trwające od ponad sześćdziesięciu lat poszukiwania biochemicznych czynników wpływających na zdrowie i chorobę spowodowały rewolucyjną zmianę naszych poglądów na naturę zaburzeń emocjonalnych i depresyjnych. Wcześniejsze dokonania były w dużej mierze dziełem przypadku i zaistniały dzięki szczęśliwym zbiegom okoliczności. Pierwsze skuteczne leki przeciwdepresyjne wprowadzono już przeszło pół wieku temu, przy czym ich mechanizm działania nadal pozostaje niejasny. Odkrycia receptorów, które są białkami tkwiącymi w żywej i wciąż podlegającej zmianom błonie komórki nerwowej oraz we wnętrzu komórki stały się przełomem w terapii i badaniach patofizjologicznych. Jak wszystkie białka w żyjącym organizmie, receptory mogą zmieniać swoją budowę, co zasadniczo modyfikuje ich właściwości i sprawia, że mogą przyłączać inne neurotransmitery o różnej lub podobnej strukturze. Pierwsza generacja leków psychotropowych działała niespecyficycznie, wpływały one więcej niż na jedną parę neurotransmitr-receptor. W rezultacie leki te miały wiele działań ubocznych. Jednak działania neurofarmakologów doprowadziły do powstania nowej generacji "czystych" leków- takich, które wywierają wpływ prawdopodobnie na jeden rodzaj receptora, ale nadal pozostaje pytanie czy to jest na pewno prawda, szczególnie, gdy poznajemy nowe aktywne substancje działające endogennie o charakterze modulującym działanie OUN.

Interpretacja skuteczności leków psychotropowych w OUN ukierunkowała badania na przyczyny chorób. Dzięki środkom stabilizującym nastrój, i przeciwdepresyjnym, stosowanym do leczenia najcięższych chorób psychicznych, dokonana się w praktyce i teorii psychiatrii rewolucja, która wciąż trwa. Chociaż racjonalne opracowywanie i ocena skuteczności wszelkich leków nie są doskonałe, leki działające w OUN są wyzwaniem szczególnym. Patogeneza zaburzeń depresyjnych nadal wymaga wielu badań, co Doktorantka

we wstępie szeroko omówiła. Ponadto nie ma możliwości odtworzenia zasadniczych cech zaburzeń psychicznych u człowieka w modelach zwierzęcych, występują również trudności w porównaniu stanów afektywnych, komunikacji i związków społecznych u zwierząt z odpowiednimi stanami u człowieka. Procedury testów na zwierzętach w procesie opracowywania nowych standardów psychoterapeutycznych mają ograniczoną użyteczność. I wreszcie, kliniczną ocenę nowych leków utrudnia brak homogenności w obrębie grup diagnostycznych i trudności związane z zastosowaniem wiarygodnych i czułych mierników efektu terapeutycznego. Dlatego też badania przedkliniczne i kliniczne środków działających w OUN często dawały wyniki niejednoznaczne lub niespójne, co wielokrotnie w rozprawie zauważa Autorka. Współczesna farmakologia dysponuje jednak wieloma technikami oceny działania znanych leków przeciwdepresyjnych i innych substancji wpływających na OUN na poziomie komórkowym i molekularnym, co przykładowo znajduje się w recenzowanej pracy. Większość leków przeciwdepresyjnych wywiera istotny wpływ na metabolizm neuroprzekazników monoaminowych i na ich receptory, szczególnie odnosi się to do noradrenaliny i serotoniny, ale wiedza ta pozostaje nadal niepełna, a spójną interpretację ogranicza brak jednoznacznej teorii psychobiologicznej zaburzeń nastroju. Szczególnie, gdy w latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych odkryto receptor kanabinoidowy (CB) i endogenny ligand, a egzogenny ligand tzn. konopie siewne ma historię stosowania w terapii od ok. 3000 lat. Stosunkowo nowe informacje o fizjologicznych mechanizmach działania układu kanabinoidowego są poważnym wyzwaniem dla neurofarmakologów.

W swojej pracy doktorskiej Autorka podejmuje ten bardzo trudny temat, stawiając sobie za cel odpowiedź na pytania: jak zmienia się poziom endokannabinoidów, poziom ekspresji ich enzymów syntetyzujących i degradujących oraz gęstości i poziomu ekspresji białek receptorów CB<sub>1</sub> i CB<sub>2</sub> w mózgu szczura po jednorazowym i chronicznym podaniu leków przeciwdepresyjnych oraz substancji o aktywności przeciwdepresyjnej. Badania te również mają pokazać poziomy tych zmian w różnych strukturach mózgu w zwierzęcych modelach depresji – po bulbektomii i szczurach Wistar-Kyoto, które są uznanymi w świecie modelami depresji. Tak postawione cele pracy spełnią nowatorskie kryteria badawcze.

Przedstawiona do oceny praca wraz z piśmiennictwem liczy 143 strony. Wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz piśmiennictwo i streszczenie - są rozdziałami pracy zgodnie ze schematami pisania prac doktorskich. Praca uzupełniona jest również wykazem skrótów, spisem tabel i rysunków oraz streszczeniem w języku angielskim. Praca wymagała od Doktorantki bardzo dużego wysiłku fizycznego uwzględniając bardzo

rozbudowaną metodykę. Napisana jest bardzo starannie i przejrzysto, ale dosyć trudno się ją czyta, ponieważ autorka używa dużo skrótów. Uwagi te nie umniejszają wartości pracy.

We wstępie, na 31 stronach Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością przedmiotu, rozpoczyna rozważaniami na temat teorii stanów depresyjnych ze szczególnym naciskiem na różne patomechanizmy ich powstawania, omawia różne układy neuroprzekaźnikowe uczestniczące w tych procesach ze szczególnym udziałem układu endokannabinoidowego. W tej części pracy również przytacza dane literaturowe o badaniach przedklinicznych i klinicznych związanych z układem endokannabinoidowym oraz strukturach mózgu gdzie te działania występują. Rozdział ten znacząco wspierany piśmiennictwem oraz 6 tabelami i jedną ryciną jest bardzo istotną częścią rozprawy, która może stanowić odrębną publikację.

Cel pracy jest ambitny, nawiązujący do najnowszych badań w tym zakresie, przedstawiony jest jasno, a na postawione pytania wyczerpująco odpowiada w dalszej części pracy, co świadczy o dojrzałości badawczej Autorki. Jestem pełen podziwu dla ogromu pracy doświadczalnej, którą wykonała.

Wybór nowoczesnych metod badawczych – chromatografia cieczowa ze spektrometrią masową, autoradiografia receptorów CB, Western blot, nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka posiadając dużą wiedzę teoretyczną i doświadczenie prawidłowo i bardzo dobrze w mojej ocenie przygotowała materiał i metodykę badań. Ten rozdział zobrazowany został również jedną ryciną i jedną tabelą. Zastosowane analizy statystyczne są właściwe dla tego typu badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt szerokiego zakresu umiejętności badawczych Doktorantki, co należy raczej do rzadkości.

Wyniki badań przedstawione na 57 stronach zawierają 12 tabel, 22 ryciny – histogramy. Dokumentacja ta jest czytelna i pokazuje właściwie i metodycznie wykonaną pracę badawczą. Doktorantka swoje wyniki w sposób właściwy próbuje uzasadnić jednocześnie będąc do nich krytyczna w tym również do modeli badawczych depresji, które stosowała. Właściwy sposób przedstawienia w dyskusji swoich wyników w kontekście zdobyczy innych autorów a zwłaszcza krytyczny stosunek do osiągnięć własnych i cudzych jest dowodem dojrzałości naukowej. Ten rozdział zawarty na 15 stronach napisany jest bardzo dobrze. Dyskusja przeprowadzona została z dużą znajomością współczesnego piśmiennictwa związanego z przedmiotem rozprawy. Na uwagę zasługuje tu konfrontowanie

własnych wyników z aktualnymi danymi do roku 2016 włącznie. Długa lista piśmiennictwa (216 pozycji), została w pełni wykorzystana.

Podsumowując, badania wykonane przez Doktorantkę pokazują, że zmiany w poziomach endokannabinoidów w różnych strukturach mózgu szczura wskazują na ich znaczącą rolę w mechanizmie przeciwdepresyjnym zastosowanych substancji leczniczych. Zasadniczym efektem pojawiającym się po przewlekłych podaniach wszystkich substancji było zwiększenie sygnalizacji endokannabinoidowej w strukturach układu limbicznego, to jest w obszarach, które związane są ze stanami depresyjnymi. Zmiany te były w większości uwarunkowane zmianami ekspresji enzymów uczestniczących w metabolizmie tych endogennych lipidów. Zastosowane substancje lecznicze wywierają różnorodny wpływ na receptory CB, a zmiany są krótkotrwałe, co sugeruje potrzebę systematycznego stosowania farmakoterapii. Większość efektów działania tych substancji przeciwdepresyjnych po ich przewlekłych podaniach zależy od stymulacji receptorów CB<sub>1</sub> i CB<sub>2</sub>, na co wskazują badania z użyciem selektywnych antagonistów tych receptorów. Jedynie mechanizm zmian w poziomie arachidonyloglicerolu w prążkowie grzbietowym po podaniach escitalopramu jest niezależny od receptorów CB<sub>1</sub> oraz zmiany poziomu arachidonyloglicerolu w korze czołowej i hipokampie oraz zmiany poziomu anandamidu w prążkowie grzbietowym po podaniach imipraminy, escitalopramu lub tianeptyny nie były zależne od receptorów CB<sub>2</sub>.

Badania te stanowią poza wartością naukową, również wartość o znaczeniu być może klinicznym, która moim zdaniem może być przesłanką do większej racjonalności stosowania leków przeciwdepresyjnych a zatem mniejszej ilości działań ubocznych. Uzyskane wyniki pokazują jedynie fragment aktywności układu nerwowego na działające substancje lecznicze przeciwdepresyjne, szczególnie w tej pracy wykazano udział w tych procesach układu endogennych kanabinoidów. Wyciągnięte wnioski w liczbie 7 odpowiadają uzyskanym wynikom w pracy.

Oceniana praca wnosi nowe elementy poznawcze i moim zdaniem odpowiada warunkom stawianym przez Ustawę rozprawom na stopień doktora nauk i dlatego stawiam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie, wniosek o dopuszczenie mgr Ireny Smagi-Maślanki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. med. Marek Kowalczyk  
specjalista neurolog i toksykolog  
1622996