Prof. dr hab. Barbara Malinowska
ZAKŁAD
FIZJOLOGII i PATOFIZJOLOGII
DOŚWIADCZALNEJ
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
15- 089 BIAŁYSTOK
ul. MICKIEWICZA 2A
tel/fax (+85) 7485699
e-mail: bmalin@umb.edu.pl

DEPARTMENT
OF EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY
AND PATHOPHYSIOLOGY
Medical University of Białystok
15-089 BIAŁYSTOK
MICKIEWICZ Str. 2A
POLAND
tel./fax (48-85) 7485699

**Ocena pracy doktorskiej mgr farm. Ireny Smaga-Maślanki pt.: „Rola układu endokanabinoidowego w patogenezie depresji i w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych".**

Kanabinoidy od tysiącleci były stosowane przez ludzi nie tylko ze względu na swe właściwości narkotyczne, dające złudne odprężenie i przejściową euforię, ale także jako środki skuteczne w leczeniu szeregu dolegliwości w tym m.in. bólu czy depresji. Nazwa pierwszego i najlepiej poznanego do tej pory endokanabinoidu anandamidu pochodzi od staroindyjskiego słowa „ananda" oznaczającego błogość. Jednak na pierwsze naukowe uzasadnienie wskazujące na potencjalny udział układu endokanabinoidowego w patogenezie depresji trzeba było czekać aż do obecnego wieku i wciąż są to wiadomości niejednoznaczne, pozostawiające szereg pytań. Tymczasem z depresją zmaga się szereg osób (jak słusznie pisze Doktorantka podając dane według Światowej Organizacji Zdrowia około 350 mln osób w różnym wieku) i wciąż brakuje skutecznej terapii.

Biorąc powyższe pod uwagę tematyka przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej mgr Ireny Smaga-Maślanki jest zarówno aktualna jak i celowa. Licząca 143 ponumerowane strony praca składa się z typowych rozdziałów: wykaz skrótów używanych w pracy, wstęp, cel, materiał i metody, wyniki, dyskusja i wnioski, spis tabel i rysunków, streszczenie pracy w języku polskim i w języku angielskim oraz aż 215 pozycji piśmiennictwa. Logiczny układ pracy, poprawny styl, prawidłowe cytowanie i zestawienie literatury, a także przedstawienie i omówienie wyników wskazują na dobrze opanowaną przez Doktorantkę umiejętność pracy naukowej. Nowatorstwo przedstawionej mi do oceny pracy podkreśla ponadto fakt, że jedynie 8% pozycji literaturowej pochodzi z ubiegłego wieku, a aż 12% z lat 2014-2016.

W liczącym 31 stron wstępie Doktorantka w bardzo ciekawy i przystępny sposób wprowadza czytelnika w 2 podstawowe zagadnienia stanowiące tematykę pracy: (1) depresję, w tym zwierzęce modele i testy w przedklinicznych badaniach nad aktywnością przeciwdepresyjną oraz (2) układ endokanabinoidowy, w tym jego związek z depresją. Przystępność tekstu zdecydowanie zwiększa 6 tabeli

oraz 1 schemat, a także konsekwentny sposób opisania znaczenia poszczególnych składowych układu endokanabinoidowego w depresji (endogennych ligandów, enzymów zaangażowanych w ich syntezie i degradacji oraz receptorów $CB_1$ i $CB_2$) z podziałem na badania przedkliniczne i kliniczne. Na uwagę zasługują przy tym 2 bardzo obszerne i szczegółowe tabele 5 i 6, w których Doktorantka umiejętnie zestawiła wyniki dotychczasowych badań przedklinicznych i klinicznych dotyczących znaczenia endokanabinoidów w depresji. Chciałabym w tym miejscu podkreślić, że część wstępu, w tym między innymi wspomniane powyżej 2 tabele oraz schemat obrazujący działanie endokanabinoidów na receptory kanabinoidowe zostały już opublikowane w pracy przeglądowej Smaga i wsp., (Current Neuropharmacology 2014;12,462-474; IF 3,049; pkt MNiSW 35). Napisany w ten sposób wstęp zaznajamia czytelnika ze wszystkimi najważniejszymi zagadnieniami oraz składowymi układu endokanabinoidowego badanego w niniejszej pracy i umiejętnie doprowadza do celu pracy. Czuję jedynie niewielki niedosyt w kontekście 6 wniosku pracy, jeżeli chodzi o zbyt krótkie opisanie funkcji receptorów $CB_2$ w OUN, poza stwierdzeniem, że „w ostatnim czasie wykazano również obecność receptorów $CB_2$ w OUN" (str. 13; są to nieliczne prace np. autorstwa pary J. Kim i Y. Li z ostatnich 2 lat) oraz określeniem, że za hamowanie presynaptyczne uwalniania neurotransmiterów odpowiadają receptory $CB_1$, a nie tylko CB (str. 12). W Tabeli 5 i 6 nie wyjaśniono, czy „-„ określa brak zmian, czy, że nie badano danej struktury mózgu.

Cel pracy doktorskiej mgr Ireny Smaga-Maślanki jest zasadny i został precyzyjnie określony. Cel ten jest jednocześnie bardzo ambitny, złożony, a jego realizacja wiązała się z opanowaniem szeregu często bardzo precyzyjnych metod i późniejszą bardzo trudną interpretacją olbrzymiej ilości wyników. Doktorantka oznaczała 6 składowych układu endokanabinoidowego: poziomy 2 ligandów (anandamidu i 2-AG), ekspresję 2 enzymów syntetyzujących (NAPE-PLD i DAGLα) i degradujących (FAAH i MAGL) oraz gęstość i poziom ekspresji białek receptorów $CB_1$ i $CB_2$ w 6 strukturach mózgu (korze przedczołowej i czołowej, hipokampie, prążkowiu grzbietowym, jądrze półleżącym przegrody oraz móżdżku) w warunkach kontrolnych, oraz po ostrym i chronicznym stosowaniu 3 leków przeciwdepresyjnych o różnych mechanizmach działania i 2 związków o aktywności przeciwdepresyjnych

(podanych oddzielnie lub łącznie z antagonistami receptorów $CB_1$ lub $CB_2$), a także w 2 różnych modelach depresji. Zmiany określano 24 godz. lub 10 dni po ostatniej dawce, co umożliwiło ocenę trwałości zmian. Całość wskazuje na ogrom pracy, którą musiała wykonać Doktorantka i to nie tylko podczas wykonywania doświadczeń, ale także w trakcie interpretacji uzyskiwania wyników.

Materiały i metody napisane są bardzo dokładnie i świadczą o ich zrozumieniu przez Doktorantkę. Duże ułatwienie w zrozumieniu protokołu doświadczenia stanowi jego schematyczne przedstawienie. W oznaczaniu poziomu endokanabinoidów zastosowano bardzo precyzyjne badania neurochemiczne chromatografii cieczowej ze spektrometrią masową. Dodatkowe metody to 2 testy behawioralne umożliwiające ocenę rozwoju depresji, metoda Western blot, a ponadto w 23 strukturach mózgu określono gęstość receptorów $CB_1$ za pomocą autoradiografii. Niestety, Doktorantka stosując bardzo precyzyjny podział na poszczególne cele badawcze, niezbyt jasno określiła na jakich zwierzętach (Wistar czy Wistar Kyoto) wykonywane są poszczególne doświadczenia. Można się jedynie domyślać, że leki przeciwdepresyjne podawano szczurom Wistar, gdyż „szczury Wistar Kyoto po 14 dniach adaptacji dekapitowano". Nieprecyzyjne jest też stwierdzenie „Jedną grupę zwierząt wprowadzono w model depresji – bulbektomię" – znowu pytanie, których szczurów (Wistar czy Wistar Kyoto), tym bardziej, że poprzedni akapit jest o szczurach Wistar Kyoto (str. 33). Brak jest także określenia dawek chlorowodorku ketaminy i ksylazyny, a o zastosowaniu aparatu stereotaktycznego wspomniano dopiero przy opisie operacji pozornej, a nie omawianej wcześniej bulbektomii (str. 33).

Wyniki przedstawiono aż na 23 podwójnych lub potrójnych jednorodnych i prawidłowo opisanych rycinach oraz w 15 tabelach. Zostały one precyzyjnie i prawidłowo opisane, także przy zachowaniu konsekwencji i jednorodności przy opisywaniu poszczególnych składowych układu endokanabinoidwego. Dzięki temu możliwe jest szybkie zrozumienie tekstu. Pragnę podkreślić, że większość wyników została już opublikowana w pracy Smaga i wsp. (Neurotoxicity Research. 2014;26:190-206; IF 3,104; punkty MNiSW 25).

W bardzo sprawnie, biorąc pod uwagę olbrzymią ilość uzyskanych przez Doktorantkę wyników, napisanej dyskusji (15 stron), mgr I. Smaga-Maślanka

początkowo uzasadnia w skrócie cel pracy oraz wybór związków zakwalifikowanych do podawania. Wydaje mi się, że we wstępie lub w początkowej części dyskusji powinno być dokładniejsze przedstawienie stosowanych leków/związków. Występujące określenie, że zastosowano „skuteczne klinicznie leki przeciwdepresyjne o różnym mechanizmie działania (tj. imipramina, escitalopram, tianeptyna) oraz związki wykazujące aktywność przeciwdepresyjną w testach behawioralnych (tj. URB597 oraz N-acetylocysteina - lek mukolityczny)" budzi niedosyt i konieczność dodatkowego szukania pierwszych trzech leków w Tabeli 4 oraz lekkie zdziwienie przy tak skrótowym opisie leku mukolitycznego N-acetylocysteiny. Dalej Doktorantka zwraca uwagę na podobieństwa i różnice w stosunku do wcześniejszych publikacji oraz stara się wytłumaczyć mechanizmy uzyskanych zmian. W dyskusji zabrakło mi krótkiej analizy w oparciu o dane literaturowe i uzyskane w niniejszej pracy własne wyniki czy leki przeciwdepresyjne oraz związki wykazujące aktywność przeciwdepresyjną mogą powodować podobne zmiany u zwierząt/ludzi z depresją, końcowej próby oceny znaczenia uzyskanych wyników w kontekście ich terapii depresji lub przyszłych badań w tym kierunku.

Rozprawę kończy 6 wniosków, stanowiących podsumowanie głównych obserwacji pracy. Doktorantka udowodniła zależne od modelu depresji różnokierunkowe zmiany receptorowe oraz zmiany poziomów endokanabinoidów uwarunkowane zmianą ekspresji enzymów metabolizujących te lipidy. Najbardziej specyficzną strukturą wiążącą układ endokanabinoidowy z depresją okazało się prążkowie grzbietowe, co może być związane z anhedonią towarzyszącą depresji, gdyż w obu zwierzęcych modelach depresji dochodziło do zmniejszenia poziomu anandamidu, natomiast wszystkie chronicznie podawane leki/związki przeciwdepresyjne powodowały wzrost poziomu tego neuroprzekaźnika w tej strukturze mózgu. Ponadto wykazano, że leki/związki przeciwdepresyjne powodują wzrost poziomu anandamidu w hipokampie i poziomu 2-AG w prążkowiu grzbietowym, czyli w strukturach neuroanatomicznie związanych z depresją, a także zależny od struktury i badanego leku/związku – zmiany gęstości/ekspresji receptorów CB w mózgu. Nie są to jednak trwałe zmiany, gdyż po 10 dniach utrzymywały się jedynie w przypadku escitalopramu. Bardzo ciekawymi i ważnymi wynikami są obserwacje z użyciem selektywnych antagonistów receptorów $CB_1$ i $CB_2$

wykazujących specyficzność większości powstałych efektów pod wpływem podań leków/związków przeciwdepresyjnych związane z aktywnością receptorów $CB_1$ i $CB_2$, a tym samym wskazującym na nowy potencjalny punkt uchwytu działania związków przeciwdepresyjnych. Na uwagę zasługuje przy tym wykazanie po raz pierwszy udziału receptorów $CB_2$ w mechanizmie zmian adaptacyjnych pod wpływem leków przeciwdepresyjnych. W swoim ostatnim wniosku Doktorantka stwierdza, że URB597 – związek hamujący metabolizm endokanabinoidów – wykazuje podobne do badanych leków przeciwdepresyjnych nasilenie poziomu anandamidu w hipokampie i prążkowiu grzbietowym oraz poziomu 2-AG w prążkowiu grzbietowym u szczurów. Powstaje pytanie, jak można wytłumaczyć fakt, że w pozostałych strukturach mózgu nie doszło do wzrostu poziomu anandamidu przy zahamowaniu jego rozkładu?

Wszystkie skróty w pracy są dokładnie wyjaśnione i zamieszczone w tabelce ze skrótami. Jednak ich ilość utrudniała czytanie. Praca napisana jest bardzo ładną polszczyzną. Zauważyłam jedynie nieliczne uchybienia związane z terminologią jak (1) „glikokortykoidy", prawidłowo „glikokortykosteroidy", czy (2) „receptory CB są umieszczone głównie membranowo", prawidłowo: „w błonie komórkowej"; (3) „u stresowanych myszy", prawidłowo „myszy poddanych stresowi".

Biorąc pod uwagę fakt, że rozprawa doktorska jest przeważnie pierwszą poważną pracą naukową, nieliczne uwagi lub zagadnienia do dalszej dyskusji w niczym nie umniejszają wartości niniejszej rozprawy doktorskiej. Otrzymane wyniki są nowatorskie, ciekawe, spójne, bardzo dobrze przedstawione i przedyskutowane i uzyskane w oparciu o zastosowanie precyzyjnych, wnikliwie opisanych metod. Stanowią one pierwszą tak kompleksową, dokładną i różnorodną analizę znaczenia układu endokanabinoidowego w patogenezie depresji i w mechanizmie działania leków przeciwdepresyjnych. Ponadto część niniejszej pracy doktorskiej została już opublikowano w 2 publikacjach o łącznym IF 6,1 i punktach MNiSW 60. Dlatego też przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Irena Smaga-Maślanki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a jednocześnie o **wyróżnienie** pracy doktorskiej.

KIEROWNIK
Zakładu Fizjologii i Patofizjologii
Doświadczalnej
prof. dr hab. Barbara Malinowska

Białystok, 29 sierpnia 2016 r.