

Łódź, 26 lipca 2020 r.

dr hab. Paweł Parniewski
Profesor
Instytut Biologii Medycznej PAN

Szanowny Pan
Prof. dr hab. Andrzej Kruk
Przewodniczący Komisji UŁ
do spraw stopni naukowych
w dyscyplinie nauki biologiczne.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Wigner na temat:

„*Rola stresu oksydacyjnego i nitracyjnego oraz szlaku katabolitów tryptofanu w patogenezie depresji*”.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska podejmuje niezwykle istotną tematykę badawczą, dotyczącą mechanizmów depresji, jednego z najpoważniejszych zaburzeń afektywnych człowieka. Autorka rozprawy postanowiła określić szczegółowo związki polimorfizmów SNP w wybranych genach zaangażowanych w mechanizmy stresu oksydacyjnego, nitracyjnego oraz metabolizmu tryptofanu z ryzykiem występowania tej choroby oraz wpływu łagodnego stresu i terapii wenflaksyną na poziom ekspresji tych genów.

Praca doktorska jest *de facto* podsumowaniem i omówieniem wyników badań Autorki opublikowanych w postaci pięciu prac eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej, które ukazały się w znakomitych czasopismach, ujętych w tzw. Liście Filadelfijskiej.

Na układ pracy składają się:

1. **Źródła finansowania**, grant NCN OPUS 10, którego kierownikiem był prof. dr hab. Tomasz Śliwiński, Promotor Doktorantki oraz dotacja celowa Wydziału BiOŚ UŁ na finansowanie badań służących rozwojowi młodych naukowców. Jest oczywiste, że badania naukowe wymagają nakładów finansowych, brakuje w tej części informacji o wysokości uzyskanych środków.
2. **Dorobek naukowy**. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, jedna praca przeglądowa i pięć prac eksperymentalnych, to dorobek bardzo dobry, nieczęsto aż tak wysoki przy realizacji zadań, prowadzących do uzyskania stopnia doktora. Sumaryczny *Impact Factor* tych czasopism, wynoszący prawie 22, to świadectwo wysokiej klasy prowadzonych badań, co jest niewątpliwą zasługą Doktorantki i Jej Promotora. Dorobek ten oceniam bardzo wysoko.
3. **Pozostały dorobek naukowy**, to zestaw dwóch publikacji autorskich i dziesięciu współautorskich o łącznym współczynniku IF prawie 60. Jest to osiągnięcie samo w sobie, za co składam Doktorantce szczerze gratulacje. Ten element dorobku Pani mgr Pauliny Wigner oceniam również bardzo wysoko.
4. **Wybrane komunikaty zjazdowe**. Na tę część dorobku Doktorantki składa się 11 komunikatów, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, prezentującym wyniki i 14 komunikatów, w których jest współautorem. Świadczy to o dużym zaangażowaniu w prowadzenie badań naukowych i o umiejętności prezentowania publicznie uzyskanych przez siebie rezultatów.

5. **Streszczenie.** W tej części rozprawy Autorka zawarła zasadnicze elementy obejmujące omówienie depresji w kontekście innych zaburzeń afektywnych oraz zacytowała wiele danych epidemiologicznych, ukazujących jak istotnym problemem klinicznym a także ekonomicznym jest ta jednostka chorobowa. Zwróciła również uwagę, co uważam za bardzo istotne, że cyt.: *...ponad połowa chorych nie korzysta z pomocy lekarza, a około jedna trzecia pacjentów poddanych leczeniu nie odpowiada na tradycyjną farmakoterapię*". Już samo to, jest istotnym powodem prowadzenia szeroko zakrojonych badań, jakich podjęła się Doktorantka. Dodatkowo, wieloczynnikowy i nie do końca zbadany mechanizm ujawniania się tej choroby, jej nasilenia i prognoz na wyleczenie stanowi wystarczającą podstawę dla podjęcia tych badań.

Analizując dane dostępne w literaturze naukowej, Doktorantka opisała dokładnie najważniejsze fakty i wynikające z nich konkluzje dotyczące najbardziej prawdopodobnych mechanizmów leżących u podstaw rozwoju depresji – indywidualnych cech biologicznych, czynników genetycznych, molekularnych i środowiskowych. Brak równowagi pomiędzy produkcją a neutralizacją reaktywnych form tlenu i azotu a również zaburzeń metabolizmu tryptofanu uznała słusznie za jedno z ważniejszych elementów istotnych w powstaniu i rozwoju tej choroby. Na Rycinie 1 pokazano ogólny schemat metabolizmu tryptofanu, co jest przydatne w zrozumieniu wielorakiej roli tego aminokwasu. Jednak, wiele elementów na rycinie jest nieczytelnych, nie wszystkie są opisane, ma zbyt małe rozmiary fontów, co jednak to zrozumienie utrudniło. Pomocny jest podpis do ryciny, który to ułatwia interpretację schematu.

W dalszej części **Streszczenia** Doktorantka szczegółowo dyskutuje możliwy udział wybranych genów i ich produktów, istotnych w procesach stresu oksydacyjnego i nitracyjnego oraz genów zaangażowanych w katabolizm tryptofanu. Na tej podstawie określa zestaw enzymów wybranych do badań a ich opis i charakterystykę przedstawia w Tabeli 1. W tej sekcji pracy doktorskiej Autorka prawidłowo przedstawiła tło naukowe planowanego projektu, co doprowadziło do określenia celów pracy. Tę część doktoratu oceniam również wysoko.

6. **Cel pracy.** Cele pracy zostały przedstawione prawidłowo, zakładając zasadnicze zadania mające określić związki genotypów i alleli 16 polimorfizmów typu SNP występujących w genach zaangażowanych w stres oksydacyjny, stres nitracyjny oraz szlak katabolizmu tryptofanu, z ryzykiem wystąpienia depresji, a także zbada wpływ procedury łagodnego stresu i terapii wenflaksyną na poziom ekspresji i stopień metylacji regionów promotorowych powyższych genów.
7. **Materiały i metody.** Zastosowane materiały i metodyka badawcza nie budzą żadnych wątpliwości. Pacjentów klasyfikowano do badań biorąc pod uwagę właściwe kryteria wykluczenia, zgodne z międzynarodowymi standardami. Wyjaśnienia wymagałoby określenie „... *innych zaburzeń osi I i II*”, nie jest to wyjaśnione w odpowiednim paragrafie. Co istotne i oczywiste w tego typu badaniach, Autorka uzyskała odpowiednią zgodę Komisji Bioetycznej UM w Łodzi.

Izolację genomowego DNA i oznaczanie genotypów polimorfizmów SNP badanych genów zostało przeprowadzone odpowiednimi technikami biologii molekularnej i analizowane stosując właściwe oprogramowanie.

Charakterystyka zwierząt, a właściwie opis procedur stresowych stosowanych w ramach prowadzonych eksperymentów, obejmowała pięć grup osobników: zwierzęta kontrolne, stresowane, kontrolne poddane terapii wenflaksyną, stresowane po podawaniu (nie terapii!) soli fizjologicznej i stresowane po terapii wenflaksyną. Wybór takich grup jest zasadniczo

prawidłowy, nie ma natomiast, co wydaje się ważne, wyjaśnienia, dlaczego wybrano jedynie osobniki męskie? Wszystkie badania uzyskały zgodę odpowiedniej Komisji Bioetycznej.

W kolejnych podrozdziałach Autorka opisuje techniki stosowane w oznaczaniu poziomów ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w trzech badanych systemach (stres oksydacyjny, nitracyjny i szlak katabolitów tryptofanu) oraz stopnia metylacji ich regionów promotorowych. Doktorantka opisuje stosowane techniki molekularne i wyjaśnia zasadę ich działania, co jest przydatne w zrozumieniu tych technik. Podobnie, opisuje oznaczanie ilościowe białek zaangażowanych w badanych procesach.

Odpowiednie Tabele prezentują zestaw użytych starterów do oznaczania poziomu metylacji regionów promotorowych oraz warunki inkubacji przeciwciał w reakcjach Western Blot.

Całość uzupełnia opis stosowanych metod statystycznych.

Ten rozdział oceniam dobrze, jedyna uwaga, to brak wyraźnego podziału sekcji na część dotyczącą badań na zwierzętach i część zawierającą opis badań materiału od pacjentów.

8. **Wyniki** zostały omówione skrótowo, podsumowując główne rezultaty uzyskane w ramach przeprowadzonych badań. Jest to zrozumiałe, ze względu na to, że pełne spektrum analiz zostało szczegółowo omówione w publikacjach naukowych wchodzących w rozprawę doktorską. Również i w tej części brakuje według mnie jasnego rozdziału tego, co dotyczy badań pacjentów od tego, co zostało przeprowadzone z udziałem zwierząt laboratoryjnych. Nie zmienia to jednak faktu, że Autorka przedstawiła ciekawe korelacje pomiędzy pięcioma polimorfizmami w badanych genach *SOD2*, *CAT* i *GPx4*, wykazując tendencje zwiększonej częstości występowania depresji lub zależność odwrotną. Co ciekawe, nie wykazano takich korelacji w przypadku genów *NOS1* i *NOS2*. Interesujący wydaje się być również odmienny rozkład genotypów i polimorfizmów w obrębie płci, wykazujący różnice pomiędzy populacją kobiet i mężczyzn. Podobnie, w przypadku analiz wybranych polimorfizmów w genach zaangażowanych w szlak katabolitów tryptofanu Doktorantka udowodniła, że w zależności od rodzaju polimorfizmu mamy do czynienia ze zwiększoną lub obniżoną częstością występowania depresji i również, że niektóre polimorfizmy miały charakter neutralny. I tu również, różnice pomiędzy populacją mężczyzn i kobiet okazały się być istotne statystycznie pokazując, że jeden z genotypów genu *KATI* był negatywnie skorelowany z rozwojem depresji, ale tylko w populacji mężczyzn.

W tej części omówienia Wyników zdecydowanie brak syntetycznego podsumowania wpływu poszczególnych polimorfizmów w badanych genach na obserwowane efekty fenotypowe. Zbiorcza tabela bardzo ułatwiłaby możliwość całościowego spojrzenia na wyniki tych badań. Podsekcja dotycząca oznaczenia poziomu spożycia roztworu sacharozy jako miary zdolności reagowania na bodźce nagradzające, to dwa zdania, które można było prawdopodobnie zawrzeć w kolejnych podrozdziałach.

W dalszych dwóch częściach Autorka przedstawiła wpływ łagodnego stresu i terapii wenflaksyną na zmiany ekspresji na poziomie mRNA i białka oraz stopień metylacji regionów promotorowych genów powiązanych ze stresem oksydacyjnym, nitracyjnym oraz genów biorących udział w katabolizmie tryptofanu. Efekt ten przejawiał się różnorodnie, w zależności od tego, w jakiej lokalizacji w mózgu był on określany. Także i tutaj, przydatne byłoby przedstawienie uzyskanych obserwacji w postaci ujmującej to syntetycznie Tabeli.

9. **Podsumowanie** zawiera ogólne tło naukowe, będące podstawą dla badań zawartych w niniejszej rozprawie i krótkie omówienie ewentualnych dalszych kierunków dociekań mających na celu wyjaśnienie skomplikowanego i wieloczynnikowego mechanizmu patogenezy depresji. Autorka zaznacza, co prawda jednym zdaniem, bardzo ważną konkluzję wynikającą pośrednio z Jej badań, że istotnym celem powinno być w przyszłości dążenie do

opracowania spersonalizowanych terapii, opracowywanych dla pojedynczego pacjenta. Zabrakło mi w tej części szerszego odniesienia się Doktorantki do zastosowanego zwierzęcego modelu badawczego i wynikających z tego faktu możliwych odniesień do człowieka. Jak silne odniesienia można przyjąć, bazując na wynikach uzyskanych na zwierzętach laboratoryjnych? Mając świadomość, że duża część eksperymentów nie jest możliwa do wykonania w przypadku pacjentów, jakie rozwiązana widziałaby Doktorantka dla rozszerzenia przyszlých badań?

10. **Wnioski** są przedstawione bardzo dobrze. Pokazują główne wyniki pozwalające stwierdzić, że wszystkie trzy badane mechanizmy – stres oksydacyjny, stres nitracyjny oraz zaburzenia w katabolizmie tryptofanu biorą udział w patogenezie depresji. Dodatkowo, że terapia przy użyciu wenflaksyny moduluje poziom ekspresji genów zaangażowanych w powyższe mechanizmy, i że jest to działanie specyficzne tkankowo. Brakuje mi tu jednak klarownego stwierdzenia czy i jeżeli tak, to w jakich przypadkach, wenflaksyna jest lub może być sugerowana jako lek w terapii tej przewlekłej choroby.
11. **Literatura uzupełniająca** to lista publikacji sugerowanych czytelnikowi i cytowanych w rozprawie przez Doktorantkę. Zawiera głównie prace z ostatnich 20 lat, dotyczących zagadnień powiązanych z mechanizmami depresji, mechanizmów oksydacji i nitracji, metabolizmu tryptofanu i odniesień do stosowanej metodyki badawczej. Nie wszystkie cytowania są według mnie konieczne, na przykład publikacja opisująca oznaczanie białek z użyciem odczynnika Folina z roku 1951. Niemniej jednak, dobór literatury naukowej jest prawidłowy.
12. Następnie Autorka przedstawia tekst **Rozprawy w języku angielskim** oraz
13. **Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej**. Nie mam zastrzeżeń do tych części pracy.
14. **Oświadczenia o udziale w publikacjach**. We wszystkich przedstawionych publikacjach udział Doktorantki był wiodący, wynosił 55-60% i obejmował zaplanowanie prac, realizację części doświadczalnej, przygotowanie rycin i tabel, opracowanie i interpretację wyników oraz przygotowanie manuskryptu.
15. Autorka uzyskała również wymagane **oświadczenia od współautorów**, potwierdzające Jej udział jako głównego Autora prac.

Podsumowując, należy stwierdzić, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Wigner, stanowi zbiór bardzo dobrych publikacji naukowych, w których Doktorantka zaprezentowała oryginalne rozwiązania podjętych problemów badawczych, dowiodła, że posiada umiejętności prowadzenia samodzielnej pracy naukowej i posiada niezbędną wiedzę teoretyczną do prowadzenia tych badań.

Zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do Spraw Naukowych w dyscyplinie nauk biologicznych o nadanie Pani mgr. Paulinie Wigner stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie, doceniając wkład Doktorantki w rozwój badań dotyczących patogenyzy depresji, wysoki poziom zaprezentowanych publikacji naukowych wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

z poważaniem,

dr hab. Paweł Parniewski

dr hab. Paweł Parniewski, prof. IBM PAN

Kierownik
Pracowni Genetyki Molekularnej