



Prof. dr hab. Paweł Parniewski
Instytut biologii Medycznej PAN

Łódź, 9 września 2021 r.

Szanowna Pani
Prof. dr hab. Agnieszka Marczak
Przewodnicząca Komisji UŁ
do spraw stopni naukowych
w dyscyplinie nauki biologiczne

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Białek zatytułowanej:
„Rola stanu zapalnego w patogenezie zaburzeń depresyjnych”.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska podejmuje niezwykle istotną tematykę badawczą, dotyczącą mechanizmów depresji, jednego z najpoważniejszych zaburzeń afektywnych człowieka. Praca ta jest kontynuacją znakomitych badań prowadzonych w zespole kierowanym przez Profesora Tomasza Śliwińskiego.

Autorka rozprawy postanowiła wyjaśnić szczegółowo: 1) związki pomiędzy występującymi polimorfizmami SNP w 8 genach (*IL1A*, *IL1B*, *TNFA*, *TGFA*, *TGFB*, *PTGS2*, *IRF1*, *IKBKB*) z ryzykiem depresji, skutecznością jej leczenia i przebiegiem choroby, 2) określić wpływ procedury łagodnego stresu oraz terapii wenflaksyną na poziom ekspresji pięciu z powyższych genów (*TGFA*, *TGFB*, *PTGS2*, *IRF1*, *IKBKB*) na ich poziom ekspresji oraz poziomu metylacji regionów promotorowych tych genów w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz wybranych strukturach mózgu.

Praca stanowi podsumowanie i omówienie wyników eksperymentalnych opublikowanych w postaci 3 prac eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej, które ukazały się w czasopiśmie ujętych w tzw. Liście Filadelfijskiej.

Na układ pracy składają się:

1. **Źródła finansowania**, Grant Narodowego Centrum Nauki przyznanego w ramach konkursu OPUS 10 nr 2015/19/B/NZ7/00410, którego kierownikiem był Prof. dr hab. Tomasz Śliwiński, promotor Doktorantki oraz dotacja celowa Wydziału BiOŚ UŁ na finansowanie działalności polegającej na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich.
2. **Dorobek naukowy**. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej – jedna praca przeglądowa i trzy prace eksperymentalne, to dorobek bardzo dobry przy realizacji zadań, prowadzących do uzyskania stopnia naukowego doktora. Sumaryczny *Impact Faktor* tych czasopism, wynoszący nieco ponad 14, 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 dziewięciu współautorskich publikacji eksperymentalnych o łącznym współczynniku IF ponad 35. Doktorantka jest również współautorką rozdziału w zagranicznej monografii. Ten element dorobku naukowego Pani mgr Katarzyny Białek oceniam również wysoko.



4. **Komunikaty zjazdowe.** Na tę część dorobku Doktorantki składa się 6 komunikatów, w których Doktorantka jest pierwszym autorem oraz 4 doniesienia współautorskie. Świadczy to o dużym zaangażowaniu w prowadzenie badań naukowych i o umiejętności prezentowania publicznie uzyskanych rezultatów.
5. **Streszczenie.** W tej części rozprawy Autorka zawarła zasadnicze elementy obejmujące omówienie wielorakich czynników epidemiologicznych, ukazujących jak istotnym problemem klinicznym jest ta jednostka chorobowa. Zwróciła również uwagę, że duża część, ponad jedna trzecia pacjentów, nie odpowiada na tradycyjnie stosowane leki przeciwdepresyjne a wieloletnie badania nadal nie były w stanie zdefiniować molekularnych aspektów leżących u podstaw depresji. Analizując literaturę naukową Doktorantka zauważyła, że poza czynnikami genetycznymi, środowiskowymi i osobniczymi cechami biologicznymi, coraz częściej wśród czynników predysponujących do rozwoju i nasilenia epizodów depresyjnych, upatruje się w istotnej roli stanu zapalnego (tzw. hipoteza cytokinowa) i, co według mnie jest niezwykle istotne – w przedłużającej się aktywacji układu odpornościowego. W połączeniu z sytuacjami generującymi stres, tworzy to z pewnością istotne podstawy dla ujawnienia się lub nasilenia zaburzeń afektywnych. Autorka omówiła dane naukowe dotyczące zwiększonego poziomu cytokin prozapalnych we krwi a także zwiększone stężenie innych markerów stanu zapalnego, w tym białek fazy ostrej, prostaglandyn, cząsteczek adhezyjnych i chemokin, obserwowane u pacjentów ze zdiagnozowaną depresją. Zacytowała również badania mówiące, że nadmierne pobudzenie układu odpornościowego wpływa na metabolizm tryptofanu, co może powodować ograniczenie ilości tego aminokwasu, jako prekursora serotoniny.

Biorąc pod uwagę zebraną wiedzę, dotyczącą etiologii depresji Pani mgr Katarzyna Białek postanowiła zbadać polimorfizmy wybranych genów zaangażowanych w procesy zapalne, mogących wpływać na aktywność kodowanych białek. Zanalizowała wpływ procedury chronicznego łagodnego stresu, stanowiącej zwierzęcy model depresji oraz terapii wenlafaksyną na poziom ekspresji genów związanych ze stanem zapalnym. Dodatkowo, postanowiła sprawdzić czy wyżej wymienione czynniki wpływają na modyfikacje epigenetyczne, takie jak zmiana stopnia metylacji regionów promotorowych badanych genów. Tę część rozprawy oceniam bardzo wysoko, również, jako źródło istotnych informacji, dotyczących etiologii depresji oraz metod skutecznego jej leczenia.

6. **Cel pracy.** Zostały przedstawione prawidłowo, w postaci trzech głównych zadań badawczych, mających określić 1) związek obserwowanych genotypów i alleli polimorfizmów SNP wybranych genów z ryzykiem wystąpienia depresji, skutecznością leczenia przeciwdepresyjnego, wiekiem chorego podczas pierwszego epizodu oraz ciężkością nasilenia objawów; 2) wpływ procedury chronicznego łagodnego stresu, stanowiącej zwierzęcy model depresji oraz terapii wenlafaksyną na poziom ekspresji wybranych genów w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz wybranych strukturach mózgu oraz 3) wpływ procedury chronicznego łagodnego stresu, stanowiącej zwierzęcy model depresji oraz terapii wenlafaksyną, na stopień metylacji regionów promotorowych badanych genów w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej oraz wybranych strukturach mózgu.



7. **Materiały i Metody.** Zastosowane materiały i metodyka badawcza nie budzi żadnych wątpliwości. Pacjentów kwalifikowano do badań biorąc pod uwagę właściwe kryteria włączenia i wykluczenia, zgodnie z międzynarodowymi standardami i Autorka uzyskała konieczną dla tych badań zgodę Komisji Bioetycznej UM w Łodzi. **Brakuje jednak danych pokazujących liczebność grupy badanej i grupy kontrolnej.**

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

Charakterystyka stosowanej Procedury CMS i opis zastosowanych bodźców został bardzo klarownie przedstawiony w Tabeli 2. **W tym miejscu również powinna się, według mnie, znaleźć informacja o liczebności grupy badanej i kontrolnej zwierząt.** Izolacje genomowego DNA oraz określenie profili ekspresji oraz stopnia metylacji badanych genów zostały opisane w sposób prawidłowy. Całość uzupełnia opis stosowanych metod statystycznych. Ten rozdział rozprawy doktorskiej oceniam również bardzo dobrze.

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 skład zaprezentowanej rozprawy doktorskiej. Pewną niedogodnością przy analizie rezultatów jest brak zaznaczenia, w której publikacji zostały zaprezentowane konkretne wyniki, co ułatwiłoby szybsze dotarcie do pełnej ich analizy. W pierwszej części Doktorantka przedstawiła uzyskane analizy materiału pobranego od pacjentów zidentyfikowanych polimorfizmów SNP i ich korelację ze statusem klinicznym. Wyniki wydają się bardzo ciekawe i pokazują, że istnieją genotypy powiązane z podwyższonym lub obniżonym ryzykiem depresji w populacji, cięższym nasileniem objawów epizodu depresyjnego a także genotypy warunkujące lepszą lub gorszą odpowiedź na farmakoterapię. Autorka zidentyfikowała także genotypy zwiększające prawdopodobieństwo depresji, inne dla kobiet i inne dla mężczyzn. **Jest to według mnie najciekawszy wynik uzyskany przez Doktorantkę, dający podstawę do opracowania specyficznych testów genetycznych, klasyfikujących prawdopodobieństwo wystąpienia, przebiegu i możliwości leczenia epizodów depresyjnych.**

Wyniki otrzymane w toku badań z wykorzystaniem modelu zwierzęcego wykazały, że zarówno procedura łagodnego stresu, jak i terapia wenflaksyną, wpływają na stopień metylacji regionów promotorowych i w ślad za tym poziom ekspresji badanych genów. Efekt ten jest zróżnicowany, w szczególności w przypadku stosowania wenflaksyny, gdzie jest on zależny od badanej struktury mózgu. Podobnie, analiza stopnia metylacji regionów promotorowych badanych genów a także efektu stosowania wenflaksyny, pokazała złożoność wykazanego zjawiska. **W mojej opinii, poza opisem tekstowym, dodatkowe przedstawienie wyników w postaci diagramów lub tabel w odniesieniu do konkretnych genów, znacznie ułatwiłoby zrozumienie prezentowanych zjawisk.**

9. **Podsumowanie** zawiera, podobnie jak Streszczenie, ogólne tło naukowe, będące podstawą dla prowadzonych badań. Autorka wymienia najważniejsze wyniki uzyskane w toku pracy i konkluduje, że „*Wszystkie zgromadzone wyniki przemawiają za faktem, że stan zapalny może odgrywać istotną rolę w molekularnym*



podłożu depresji. Dlatego też, ważne jest prowadzenie badań w tym kierunku, które przyczynią się do opracowania nowych metod diagnostycznych choroby jak również spersonalizowanej terapii przeciwdepresyjnej”, co niewątpliwie jest prawdą. **Nie mam uwag do tej części pracy.**

10. **Wnioski** są przedstawione bardzo dobrze. Wynikają z prawidłowo przeprowadzonych badań, które pozwoliły stwierdzić, że;
- 1) stan zapalny związany jest z molekularnym podłożem rozwoju depresji,
 - 2) polimorfizmy pojedynczego nukleotydu zlokalizowane w wybranych genach zaangażowanych w stan zapalny wpływają na ryzyko występowania depresji, wiek pierwszego epizodu oraz stopień nasilenia objawów,
 - 3) chroniczny łagodny stres oraz terapia wenlafaksyną wpływają na zmiany poziomu ekspresji oraz metylacji regionów promotorowych niektórych genów zaangażowanych w stan oraz stopień metylacji regionów promotorowych tych genów we krwi oraz strukturach mózgu
 - 4) Zmiany poziomu ekspresji genów oraz stopnia metylacji regionów promotorowych mogą być specyficzne dla danej tkanki.
11. **Literatura uzupełniająca** to lista publikacji z okresu 2001-2020, cytowanych w rozprawie i sugerowanych czytelnikowi. Dobór źródeł, dotyczących omawianych w doktoracie aspektów związanych z tematem dysertacji 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 – 55-70% i obejmował udział w zaplanowaniu prac i realizację części doświadczalnej, opracowanie i interpretację wyników oraz przygotowanie manuskryptu.
15. Autorka przedstawiła również wymagane **oświadczenia od współautorów**, potwierdzające Jej wiodący udział, jako głównego Autora prac.

Podsumowując, mogę stwierdzić, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Białek stanowi zbiór bardzo dobrych publikacji, w których Doktorantka zastosowała oryginalne rozwiązania podjętych problemów badawczych, dowiodła, że posiada umiejętność 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 Katarzynie Białek stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie, doceniając wkład Doktorantki w rozwój badań dotyczących etiologii depresji oraz wysoki poziom zaprezentowanych publikacji naukowych, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem,

Prof. dr hab. Paweł Parniewski