

Kraków, 29.08. 2023



Prof. dr hab. Elżbieta Pyza
Zakład Biologii i Obrazowania Komórki
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Adama Bielawskiego pt. „Badanie ekspresji białek związanych ze szlakiem przekąźnictwa mózgowych receptorów α 1adrenergicznych w zwierzęcych modelach depresji”, wykonanej w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja, Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem prof. dr hab. Ireny Nalepy

Depresja należy do głównych zaburzeń afektywnych i jest złożoną chorobą, nie tylko ze względu na objawy, ale również na etiologię i podłoże fizjologiczne. Chociaż choroba ta badana jest od wielu lat u ludzi i z wykorzystaniem zwierzęcych modeli u ssaków, a nawet bezkręgowców, mechanizmy wywołujące depresję nie są do końca poznane. Obecnie stosowane terapie depresji nie zawsze są skuteczne, a mogą wywoływać niepożądane skutki uboczne. W rozwoju depresji stwierdzono wpływ czynników psychicznych, środowiskowych, jak również podłoża genetycznego, a u chorych jak i zwierząt doświadczalnych stwierdzono zmiany poziomu wielu neuroprzekazników w mózgu, ich receptorów, a także zmiany morfologiczne neuronów, zwłaszcza w korze przedczołowej, hipokampie i ciele migdałowatym. Konsekwencją tych zmian są silne zaburzenia nastroju u chorych, smutek, myśli samobójcze, pesymizm, anhedonia, brak apetytu, zaburzenia rytmiki dobowej snu i czuwania, upośledzenie uczenia się i pamięci, brak zdolności do normalnego funkcjonowania.

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

W rozprawie doktorskiej Doktorant starał się zbadać rolę receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych, białek G związanych z tymi receptorami oraz białek ERK1/2, niektórych białek szoku cieplnego (Hsp) i apoptozy w depresji wywołanej przez brak kontaktu z matką po urodzeniu (stres manipulacji postnatalnej, PSM) u myszy i w depresji wywoływanej łagodnym chronicznym stresem (CMS) u szczurów. Ponadto, Doktorant przetestował u szczurów poddanych CMS wpływ imipraminy, leku obecnie już rzadko stosowanego u pacjentów w leczeniu depresji. Zbadanie roli receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych polegało na ocenie gęstości podtypów receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych (α_{1A} , α_{1B} i α_{1D}) i ekspresji genów kodujących te receptory w wybranych strukturach mózgu myszy i szczura. Ponadto Doktorant zbadał poziom mRNA genów kodujących podjednostkę α białek G_q , G_{11} , G_{12} , białka anty-apoptotyczne Bcl-2, Bcl-xl oraz pro-apoptotyczne Bax oraz białka HSP: Hsp72, Hsc73, Hsp90a i Hsp90b.

Rozprawa doktorska liczy 201 stron i ma następujący układ: spis treści, wykaz najważniejszych skrótów, wstęp (20 str.), założenia i cele pracy, materiały i metody (20 str.), wyniki (55 str.), dyskusja (30 str.), wnioski (13 wniosków), piśmiennictwo (230 pozycji), streszczenie, summary, wykaz rycin (48), wykaz tabel (27), lista publikacji i doniesień konferencyjnych Autora.

Odnosnie układu pracy, streszczenia w j. polskim i angielskim zwykle umieszczone są na początku pracy, po spisie treści.

Lista publikacji i doniesień konferencyjnych wskazuje na dużą aktywność p. mgr. Bielawskiego. Jednak w 11 oryginalnych publikacjach i 2 przeglądowych Doktorant nie jest autorem wiodącym (tnz. pierwszym lub ostatnim).

Pierwszym autorem jest natomiast w 2 publikacjach przeglądowych oraz w 23 z 41 doniesień konferencyjnych. Czy te wyniki badań opisane w doniesieniach konferencyjnych, w których Doktorant jest pierwszym autorem, jeszcze się nie ukazały?

Przedmiot i ocena rozprawy doktorskiej

We „Wstępie” rozprawy Doktorant opisał zagadnienia, które dobrze wprowadzają w jej tematykę. Opisał zwierzęce modele depresji, mechanizmy i

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99

szlaki neuroprzekaznictwa zaangażowane w zaburzeniach depresyjnych, stosowane leki przeciwdepresyjne oraz klasyfikację i funkcje receptorów α 1-adrenergicznych, szlaki przekazywania sygnału w komórkach od receptorów α 1-adrenergicznych, rolę białek apoptotycznych i szoku cieplnego w stresie i depresji. Wstęp został dobrze napisany pod względem merytorycznym i dowodzi szerokiej wiedzy teoretycznej Autora. We wstępie brakuje mi jedynie informacji o wpływie depresji na plastyczność mózgu, synaptyczną i neuronalną, która jest kluczowa dla funkcjonowania mózgu. Warto o tym wspomnieć, chociaż to zagadnienie nie było przedmiotem rozprawy.

Cel pracy oraz cele szczegółowe zostały jasno przedstawione. We wstępie zamieszczone są dwie dobre ryciny (Ryc. 1 - Schemat układu noradrenergicznego w mózgu szczura i Ryc. 2 - Szlaki przekazywania sygnału od receptorów α 1-adrenergicznych do wewnątrzkomórkowych białek efektorowych). W przypadku Ryc. 2 Doktorant nie podał, czy ta rycina jest jego autorstwa, czy zapożyczona z innej publikacji.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorant opisał procedury behawioralne związane z wywoływaniem stresu separacji od matki (PSM) u myszy i chronicznego łagodnego stresu u szczurów. W przypadku PSM po odstawieniu od matki, myszy przechodziły trening konsumpcji sacharozy, a następnie test sacharozowy. W przypadku CMS szczury przechodziły trening konsumpcji sacharozy, chroniczny stres (deprywacja wody i jedzenia, przechylenie klatek o 45°, przerywane oświetlenie, moczenie ściółki, stroboskopowe oświetlenie) i podawanie imipraminy.

W obu rodzajach stresu, zastosowanie testu sacharozowego miało na celu stwierdzenia anhedonii u badanych zwierząt. Gęstość receptorów α 1-adrenergicznych badano metodą autoradiograficzną z zastosowaniem [3H]prazosyny lub radioligandu i WB4101. W opisie metody autoradiograficznej nie podano, dlaczego zastosowano te substancje. Tego można się dowiedzieć dopiero z dalszych rozdziałów pracy. Rejony mózgu, w których zbadano gęstość receptorów przedstawiono szczegółowo na Ryc. 5 i 6. Poziom mRNA genów badanych białek badano metodą RT-PCR, a poziom białek metodą Western blottingu.

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99

Przeprowadzono również badania lokalizacji białek Hsp, Bcl2 i receptorów α 1-adrenergicznych w neuronach metodą immunohistochemiczną, a wyniki analizowano w mikroskopie konfokalnym. Doświadczenia zostały prawidłowo przeprowadzone, metody wyczerpująco opisane w rozprawie.

W tym rozdziale nie znalazłam jedynie informacji o wieku szczurów, u których rozpoczęto adaptację do warunków doświadczalnych.

Na końcu rozdziału M&M zamieszczono listę użytych odczynników i buforów.

Rozdział „Wyniki” jest najdłuższą częścią rozprawy. Doktorant opisał spożycie sacharozy oraz gęstość podtypów receptorów α 1-adrenergicznych w wielu (16) strukturach mózgu myszy po stresie PSM i u zwierząt kontrolnych. Ryc. 8 przedstawia przykładowe autoradiogramy gęstości receptorów, ale na zdjęciach nie zaznaczono różnic pomiędzy grupą kontrolną i CB (ten skrót nie jest też wyjaśniony ani w wykazie skrótów, ani w legendzie rycin przedstawiających wpływ stresu PSM na spożycie 0,5% roztworu sacharozy oraz autoradiogramy. Spożycie sacharozy było niższe u zwierząt doświadczalnych, a gęstość podtypów receptorów była wyższa lub niższa w różnych strukturach mózgu myszy w porównaniu z kontrolą. Wyniki przedstawiono w tabelach i na wykresach. W badaniach zastosowano różną liczbę zwierząt w grupach, w niektórych „n” było równe tylko 2 lub 3, co mogło mieć wpływ na analizę statystyczną wyników. Z kolei ekspresja genów kodujących podtypy receptorów α 1-adrenergicznych była badana tylko w trzech strukturach mózgu: korze przedczołowej, hipokampie i wzgórzu. Zmiany przedstawiono w Tab. 8 i na wykresie (Ryc. 10), jako procent kontroli.

Podobną metodą zbadano ekspresję genów kodujących wybrane białka Hsp konstitutywne i indukowane oraz białka apoptotyczne. Proszę o wyjaśnienie nazewnictwa białek Hsp, bo zwykle białka Hsp konstitutywne określa się jako Hsc, a indukowane jako Hsp, natomiast w pracy wymienione białka mają różne nazwy.

W przypadku stresu CMS u szczurów przedstawiono wyniki wpływu 3-tygodniowego CMS na spożycie 1% roztworu sacharozy oraz 8-tygodniowego CMS oraz podawania imipraminy na spożycie sacharozy. W

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99

doświadczeniach wyróżniono grupę szczurów reagujących na stres oraz nie-reagujących, ale nie podano jak liczne były to grupy. Podobnie wpływ imipraminy nie był jednakowy, ponieważ nie wszystkie zwierzęta odpowiadały na imipraminę, ale nie podano, ile zwierząt odpowiadało na imipraminę i spożycie roztworu sacharozy oraz powracało do poziomu grupy kontrolnej. W opisie wyników spożycia sacharozy nie podano jednostek, ale podane liczby prawdopodobnie odpowiadają spożyciu sacharozy podanej w gramach. Ponieważ był to roztwór sacharozy, czy podane wyniki nie powinny być podane w ml? Autor podał w legendzie Ryc. 17, że „Spożycie wyrażono w wartościach średnich [g]+SEM masy spożytej sacharozy”. To zdanie powinno raczej brzmieć: „Średnie spożycie sacharozy wyrażono w gramach”. U obu grup doświadczalnych szczurów zbadano gęstość podtypów receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych. Ryc. 18 przedstawia przykładowe autoradiogramy grupy kontrolnej (sham), reagującej na stres (stress reactive) i niereagującej (stress non-reactive), ale różnice pomiędzy grupami nie są zaznaczone i trudno jest stwierdzić na podstawie zdjęć.

U szczura gęstość receptorów zbadano w 20 strukturach mózgu, ale zmiany pomiędzy powyżej wymienionymi grupami w gęstości receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych (wiążanie ^3H prazosyny) oraz $\alpha 1\text{B}$ -adrenergicznych (wiążanie ^3H prazosyny i WB4101) w większości struktur nie były istotne statystycznie. To świadczy o zmianach gęstości receptorów tylko w określonych strukturach. Wpływ CMS oraz imipraminy na gęstość receptorów badano w 23 strukturach mózgu w grupach: sham/sal, stress/sal/, sham/IMI, sham/IMIresp, sham/IMI non- resp i również istotnie statystycznie zmiany pomiędzy grupami nie były w większości istotne statystycznie.

U szczurów po zakończeniu obu procedur doświadczalnych, w korze przedczołowej, hipokampie i wzgórzu mózgu zbadano poziom mRNA genów kodujących podtypy receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych, podjednostki α kilku białek G (Gq, G11 i G12), wybranych białek Hsp oraz białek apoptotycznych. Ponadto zbadano poziom fosforylacji kinaz ERK1/2 w korze przedczołowej i hipokampie.

W przypadku 8-tygodniowego CMS oraz podawania imipraminy zbadano również poziom wybranych białek Hsp w korze przedczołowej.

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99

W ostatnim etapie badań wykazano lokalizację białek receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych, Hsp72 i Hsp90 β oraz Bcl2 w neuronach kory mózgowej i hipokampa. Wyniki te zostały przedstawione na dobrych zdjęciach z mikroskopu konfokalnego.

Doktorant przeprowadził wszechstronne badania udziału receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych oraz białek zaangażowanych w szlakach wewnątrzkomórkowych po aktywacji receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych w odpowiedzi na stres PSM u myszy i CMS u szczura. Przeprowadzone badania wykazały różnice indywidualne u badanych zwierząt w odpowiedzi na stres i imipraminę oraz różnice w gęstości receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych w różnych strukturach mózgu, w ekspresji genów i białek związanych z sygnalizacją wewnątrzkomórkową.

Dyskusja

Dyskusja wymagała od Doktoranta dobrej znajomości literatury naukowej i dużej umiejętności interpretacji skomplikowanych wyników, które uzyskał w trakcie badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej.

Dyskusja podzielona jest na rozdziały, w których Doktorant omawia własne wyniki na tle literatury naukowej, dotyczące dwóch modeli zwierzęcych depresji. Wszystkie zastosowane procedury i wyniki, zarówno pozytywne, jak i negatywne, są wyczerpująco omówione. Doktorant porównał również zmiany w ilości receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych i białek w mózgu myszy i szczura poddanych różnym stresom, w różnych okresach życia.

Rozprawa jest wartościowa pod względem merytorycznym i naukowym. Doktorant wykazał, że stres pod wpływem separacji od matki u myszy oraz chroniczny łagodny stres u szczura, powoduje stan anhedonii i zmiany ilości receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych w specyficznych strukturach mózgu. Podawanie szczurom imipraminy w modelu CMS (8-tyg.) powodowało przywrócenie ilości receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych, podobnej do zwierząt kontrolnych. W obu modelach depresji stwierdzono również zmiany w poziomie mRNA i białek związanych z regulacją procesów neuroprotektoryjnych. Przedstawione wyniki wskazują na umiejętność prowadzenia samodzielnych badań przez Doktoranta, a dyskusja na

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99

umiejętność ich interpretacji. Rozprawa stanowi oryginalne podejście naukowe, wykazujące rolę receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych w depresji.

Autor nie ustrzegł się jednak błędów w tekście pracy. Rozwinięcia skrótów, które zostały podane w wykazie najważniejszych skrótów są inne niż te podane w tekście pracy. W wykazie skrótów są podane błędne nazwy np. GABA jako kwas γ -aminooctowy. Nie uważam również, aby była potrzeba wyjaśniania takich skrótów jak godz., min., vs., PAN. W tekście całej rozprawy są też liczne błędy literowe, składniowe, a nawet ortograficzne. To jednak nie wpływa na wysoką ocenę merytoryczną i naukową pracy. Mam jedno pytanie do Doktoranta, dlaczego zastosował imipraminę, której wpływ był już szeroko badany, a nie inny lek obecnie używany w terapii depresji.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr. Adama Bielawskiego zawiera oryginalne wyniki, które poszerzają naszą wiedzę na temat układu noradrenergicznego w depresji. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003, nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja, Polskiej Akademii Nauk, o dopuszczenie mgr. Adama Bielawskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Elżbieta Pyza



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel.: 12 664 53 37

fax: 12 664 50 99