

Prof. dr hab. Elżbieta Salińska
Zakład Neurochemii
IMDiK PAN
02-106 Warszawa, Pawińskiego 5

Warszawa, 18 sierpnia 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Adama Bielawskiego

Pt. „Badanie ekspresji białek związanych ze szlakiem przekazywania mózgowych receptorów $\alpha 1$ adrenergicznych w zwierzęcych modelach depresji”

Rozwój cywilizacji niesie ze sobą wzrost liczby przypadków chorób układu nerwowego związanych nie tylko z wydłużeniem wieku, ale też trudnościami z przystosowaniem się do codziennych wyzwań współczesnego świata i poradzenia sobie z nimi. Jednym z takich schorzeń jest depresja, objawiająca się próbami unikania codziennych wyzwań poprzez wycofanie i zaniechanie działań, co często prowadzi do głębokiej utraty wiary w siebie, myśli samobójczych, często kończącymi się samobójstwem. Przypadki takie wymagają interwencji lekarskiej i odpowiednich narzędzi do ich leczenia .

Niepokojący jest fakt, że liczba ludzi cierpiących na depresję stale rośnie, a wiek chorych obniża się. Dzisiaj można spokojnie stwierdzić, że depresja jest chorobą cywilizacyjną i jako taka wymaga szczególnej uwagi i działań mogących pomóc zahamować obserwowany wzrost zachorowań. W tym celu niezbędne jest opracowanie skutecznej terapii i leków, a do tego doprowadzić może dogłębne poznanie mechanizmów wywołujących depresję, zwłaszcza mechanizmów na poziomie komórkowym.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Adama Bielawskiego włącza się w nurt badań nad wewnątrzkomórkowymi, molekularnymi mechanizmami depresji i udziale w nich jednego z receptorów monoamin, będących jednym z głównych celów działania stosowanych obecnie leków przeciwdepresyjnych.

Tematem prezentowanej pracy są badania nad zmianami w ekspresji oraz szlakiem przekąźnictwa receptora α_1 adrenergicznego z uwzględnieniem różnic wynikających z jego podtypów.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma typowy układ, liczy ponad 180 stron tekstu, zawiera 48 rycin i 27 tabel.

Pierwsza część wstępu wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy, podając informacje na temat charakterystyki i epidemiologii depresji oraz stosowanych obecnie leków, zapoznając czytelnika ze zwierzęcymi modelami depresji stosowanymi w badaniach naukowych oraz znanymi mechanizmami i szlakami przekąźnictwa neuronalnego, które są zaangażowane w stanach depresyjnych.

Autor podaje dane dotyczące wysokiej zachorowalności na depresję w krajach Unii Europejskiej, szkoda tylko, że dane te są sprzed ponad 6 lat. Epidemia Covid-19 i wynikające z niej obostrzenia spowodowały gwałtowny wzrost liczby osób z depresją nie tylko w Europie ale i na całym świecie. Myślę, że warto by było uzupełnić rozprawę aktualnymi danymi, według których ilość przypadków depresji w UE wzrosła z 4.5% populacji w roku 2016 do 7.2% w 2022, nie mówiąc o tym, że gwałtownie wzrósł udział dzieci i młodzieży.

W dalszej części wstępu znajdujemy informacje o stosowanych obecnie lekach przeciwdepresyjnych i nieco więcej informacji o leku stosowanym w prezentowanych w rozprawie badaniach - imipraminie. W tej części wstępu zabrakło ryciny przedstawiającej miejsca działania opisanych leków, która by znacznie przybliżyła temat czytelnikowi, ale jest to tylko sugestia.

Nieco zamieszania wprowadzają też określenia „up” i „down” regulacja (dopaminergiczna, serotoninericzna), nie ze względu na swoje dosłowne znaczenie, ale na brak wskazania konkretnego czynnika, który miał by się zmieniać. Czy chodzi o aktywność lub gęstość receptorów czy może zwiększenie stężenia przekąźnika?

Opis klasyfikacji, funkcji i rozmieszczenia receptorów adrenergicznych oraz opis białek biorących udział w wewnątrzkomórkowych szlakach uruchamianych przez aktywację receptorów adrenergicznych oraz Rycina 2 dopełniają część informacyjną wstępu.

Uwaga do Ryc. 2 – strzałki łączące poszczególne elementy ryciny są różne (czerwone, żółte pełne i przerywane). Czy jest to zamierzony efekt? Jeśli tak to w legendzie do ryciny powinien znaleźć się opis ich znaczenia.

Założenia i cel pracy wytyczają ścieżkę badawczą przedstawionej rozprawy i jasno określają iż autor spodziewa się wyjaśnić czy zaburzenia depresyjne wpływają na ekspresję białek związanych z przekazywaniem sygnału generowanego przez receptory $\alpha 1$ -adrenergiczne oraz ekspresję samych receptorów i czy podawanie odpowiedniego leku o działaniu antydepresyjnym będzie miało wpływ na ewentualne zmiany. Wymienione szczegółowe cele podają listę białek, których ekspresja będzie badana, głównie na poziomie mRNA, w dwóch różnych zwierzęcych modelach depresji. W celach szczegółowych w punkcie 3 zabrakło jednak informacji jakie białka będą badane w grupach zwierząt poddanych leczeniu.

Rozdział poświęcony metodom zastosowanym w badaniach przedstawionych w rozprawie, podaje bardziej szczegółowe informacje dotyczące użytych zwierzęcych modeli stresu/depresji, testu sacharozowego oraz sposobu podawania leku. Zarówno myszy model stresu manipulacji postnatalnej (czyli czasowego oddzielania od matki) jak i szczurzy model chronicznego stresu w pełni oddają procesy prowadzące do maksymalnego stresu i depresji.

Mam tylko małe zastrzeżenia do opisu procedury testu sacharozowego w paragrafie 3.1.1; umieszczenie go przed opisem stresu PSM wprowadza zamęt i dopiero Ryc. 3 uświadamia czytającemu, które ze zwierząt poddawano temu testowi. Łatwiej by było, gdyby kolejność paragrafów 3.1.1 o raz 3.1.2 była odwrotna.

W dalszej części rozdziału zgrabnie opisane są zastosowanie metody biochemiczne i molekularne, oraz odpowiedni do tych metod sposób przygotowywania materiału biologicznego. Do tej części tekstu mam tylko jedną uwagę - w części poświęconej autoradiografii receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych zabrakło informacji uzasadniającej użycie znakowanej prazosyny i WB4101. Informacja, że jeden z tych związków jest selektywnym blokerem receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych, natomiast drugi jest antagonistą receptora $\alpha 1B$ -adrenergicznego ułatwia zrozumienie metody. Mam też pytanie odnośnie nakładania ligandów na preparat – czy oba związki były podawane

jednocześnie czy najpierw WB4101 a potem znakowana prazosyna? Może to mieć wpływ na wiązanie znakowanego ligandu.

Wyniki prezentowane w Rozdziale 4 przedstawionej do oceny rozprawy są interesujące i jasno pokazują, że wywołana u zwierząt depresja prowadzi do zmian w gęstości oraz ekspresji mRNA całej puli receptorów adrenergicznych $\alpha 1$ oraz specyficznych zmian w badanych podtypach. Zmiany gęstości odnotowano w obu modelach zwierzęcej depresji, jednak ich kierunek pokrywał się jedynie w przypadku wzgórza, gdzie odnotowano spadek w obu modelach.

W badaniach autoradiograficznych ilość przeanalizowanych w tych doświadczeniach struktur mózgu wskazuje na żmudność pracy i niełatwe przeanalizowanie obserwowanych zmian. Za to należy się Doktorantowi duży plus.

Przedstawione wyniki wskazują też na zmiany ekspresji mRNA białek z grupy białek szoku cieplnego Hsp70 i Hsp90 i białek z grupy Bcl-2 w obu modelach depresji, jednak jak to pokazano w tabelach zamieszczonych w Dyskusji, brak jest korelacji między tymi wynikami i w każdym modelu charakteryzują się one nieco innym wzorem. Pomiary ekspresji białek grupy G oraz ERK1/2 wykonano tylko w modelu chronicznego łagodnego stresu, choć w obu wariantach; nie wykazały one jednak znaczących zmian. Podawanie imipraminy w wariantcie 8 tygodniowego stresu, mimo dobrego efektu behawioralnego, nie zmieniało w zasadniczy sposób ani ekspresji badanych receptorów ani badanych białek, a jeśli już to głównie w grupie określonej jako nieodpowiadająca behawioralnie na stres.

Generalnie ilość przedstawionych wyników jest imponująca, jednak ta część rozprawy jest pełna błędów edytorskich co sprawia, że podoba mi się najmniej (Załącznik 1). Ponadto muszę zwrócić uwagę na błąd, który pojawił się w opisie rycin przedstawiających zdjęcia autoradiogramów – Bregma jest anatomicznym punktem orientacyjnym na czaszce w miejscu, w którym szew wieńcowy przecina się prostopadle ze szew strzałkowym, od którego liczy się pozycje struktur mózgu do przodu (+) lub do tyłu (-) przy przekroju koronalnym i określa się jako np. +1.20 mm od bregmy. Określenie Bregma 1.20 mm nie jest właściwe.

Wielość i różnorodność wyników badań przedstawionych przez Doktoranta w prezentowanej rozprawie doktorskiej stwarza niewątpliwie trudności w ich interpretacji,

jednak doktorant poradził sobie z tym wyzwaniem. Szeroka dyskusja, podparta dobrze dobraną literaturą oraz trzema tablicami, w których autor próbuje usystematyzować otrzymane wyniki wskazuje na umiejętność radzenia sobie z trudnym materiałem naukowym i wyciągania odpowiednich wniosków z otrzymanych danych.

Jednak nieco zawiodła mnie część prezentująca właśnie te wnioski. Po przedstawieniu 13 wniosków cząstkowych, silnie opartych na otrzymanych wynikach, zabrakło ogólnego podsumowania, określającego jasno czy otrzymane wyniki potwierdzają główne założenia przedstawionej rozprawy czy też sugerują inną odpowiedź. Zamiast tego Uwagi Końcowe podsuwają następne pytania i propozycje badań mających dostarczyć więcej wiedzy o udziale receptorów $\alpha 1$ -adrenergicznych w depresji i ewentualnym molekularnym celu przyszłych, bezpiecznych leków przeciwdepresyjnych.

Osobiście uważam, że bardzo ciekawym wątkiem prezentowanej rozprawy są wykazane zmiany ekspresji receptorów adrenergicznych typu $\alpha 1B$ i interesowałoby mnie bardzo jaką rolę odgrywają w depresji właśnie te zmiany.

Całość rozprawy doktorskiej wskazuje na dojrzałość mgr Bielawskiego jako badacza i na jego umiejętność radzenia sobie z trudnymi wynikami. Jednak według mnie doktorant powinien jeszcze popracować nad jasnością oraz systematycznością przekazu przy pisaniu przyszłych publikacji.

Na końcu przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej znajduje się spis 14 publikacji oryginalnych i przeglądowych, które zostały opublikowane w czasopismach o międzynarodowej renomie, w których mgr Adam Bielawski jest współautorem. Znajduje się tam również spis 41 doniesień konferencyjnych prezentowanych na konferencjach międzynarodowych i krajowych, w większości z nich mgr Bielawski jest pierwszym autorem. Jest to dodatkowym dowodem, że Doktorant jest doświadczonym badaczem, konsekwentnym w kierunku swoich badań.

Podsumowując, chciałam zapewnić, że wspomniane uchybienia w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej nie umniejszają jej wartości. Warsztat metodologiczny Doktoranta wskazujący na doświadczenie w prowadzeniu pracy badawczej oraz szeroka znajomość literatury tematu dobrze rokuje na badawczą przyszłość Doktoranta.

W moim przekonaniu rozprawa doktorska mgr Adama Bielawskiego spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003, nr 65, poz.595 z późn. zm.).

Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Naukowej o dopuszczenie mgr Adama Bielawskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego wszczętego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.



Prof. Elżbieta Salińska

Załącznik 1. do recenzji rozprawy doktorskiej mgr Adama Bielawskiego

Najważniejsze błędy edytorskie i inne uwagi w rozdziale Wyniki:

1. Tab. 8 C – wartość ekspresji mRNA receptora $\alpha 1D$ we wzgórzu u zwierząt z grupy CB jest znacząco wyższa niż w kontroli. Czy naprawdę jest to wynik nieznamienny?
2. Str. 70 i 71 – w tekście wspomniany jest spadek ekspresji mRNA Hsc73 i odnośnik do Ryc. 11A – zmiany dotyczą Hsc72. Podobnie – do zmian w ekspresji mRNA Hsc90 α przypisana jest Ryc. 12B odnosząca się do Hsc90 β .
3. Str. 76 – w paragrafie 4.2.1.1. w drugim zdaniu „grupa nie reagująca na stres (grupa stress reactive) – chyba powinno być non-reactive
4. Ryc. 21 – dwa ostatnie panele zdjęć powinny chyba być podpisane stress/IMI resp i stress/IMI non-redp, a nie sham/IMI resp i sham/IMI non-resp
5. Tab. 13B – ten sam błąd, ostatnia kolumna powinna być stress/IMI non-resp
6. Str. 99 – w tekście jest, że 3 tyg. CMS nie zmieniał poziomu ekspresji Bcl-2 w żadanej z badanych grup względem kontroli, w Tab. 17 ekspresja Bcl-2 wzgórza w grupie stress reactive jest prawie 150% kontroli – czy to błąd?
7. Str. 105 – w pierwszym zdaniu brakuje fragmentu – jest „We wzgórzu 8 podawanie IMI...”
8. Ryc. 40B – opisy osi Y powinny być jednakowe
9. Tab. 24A – brakuje danych z hipokampa – dlaczego?
10. Ryc. 43 – w legendzie błąd podobny do Ryc. 21 – „vs. Sham/IMI resp”
11. Ryc. 45I – panel zdjęć D,E,F bardziej przypomina zdjęcie hipokampa niż kory
12. Ryc.45 i 46 – jaki obszar hipokampa jest na zdjęciach?

W całym tekście jest dużo literówek.

