

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

Rzeszów, 21.02.2021

Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej

Przyrodniczo–Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych

Uniwersytet Rzeszowski

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Pańczyszyn-Trzewik pt.:
„Znaczenie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w patogenezie depresji -
badanie roli nuklearnego czynnika transkrypcyjnego Nrf2”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Patrycji Pańczyszyn-Trzewik pt.: „Znaczenie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w patogenezie depresji - badanie roli nuklearnego czynnika transkrypcyjnego Nrf2” została przygotowana pod kierunkiem Pana Prof. dr. hab. Gabriela Nowaka oraz Pani Dr hab. Magdaleny Sowy-Kućmy pełniącej rolę promotora pomocniczego. Praca doktorska została przygotowana w Zakładzie Neurobiologii, Pracowni Neurobiologii Pierwiastków Śladowych Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk. Badania opisane w niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach projektu naukowego PRELUDIUM 12 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt.: „Rola aktywacji nuklearnego czynnika transkrypcyjnego Nrf2 indukowanej podaniami (R,S)-Sulforafanu w regulacji zachowań typu depresyjnego w modelu usunięcia opuszek węchowych u myszy”, którego mgr inż. Patrycja Pańczyszyn-Trzewik była kierownikiem. Temat podjęty w pracy doktorskiej ma ogromne znaczenie w wyjaśnieniu etiologii depresji i zachowań samobójczych.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu liczącego 115 stron. Praca ma typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na następujące rozdziały: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie (w języku polskim i angielskim), bibliografia oraz spis rycin i tabel. Praca zawiera 25 rycin i 10 tabel obrazujących w większości uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej wyniki. Bibliografia obejmuje 220 pozycje literaturowe głównie anglojęzyczne i pochodzące z ostatnich kilku lat. W tym miejscu należy zauważyć, że w pracy nieprawidłowo umieszczono numery i tytuły tabel pod tabelą, a nie nad tabelą, co nie jest zgodne z zasadami pisania prac. Jednakże, ten błąd należy

uznać za błąd edytorski, który nie zmniejsza wysokiego poziomu merytorycznego przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

Rozprawa doktorska napisana jest w zwięzłym i syntetycznym stylu. Wstęp pracy doktorskiej stanowi dokładną analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość prowadzonych badań. Wstęp pracy jest podzielony na trzy podrozdziały. W pierwszym podrozdziale Wstępu przedstawiono opis etiopatogenezy zaburzeń depresyjnych, w tym teorii zapalnej depresji i roli stresu oksydacyjnego w patogenezie i farmakoterapii depresji. W drugim podrozdziale Wstępu przedstawiono opis znaczenia ścieżki sygnałowej Nrf2-zależnej w patogenezie depresji. W trzecim podrozdziale Wstępu opisano rolę sulforafanu jako aktywatora Nrf2 i potencjalnego nowego celu terapii przeciwdepresyjnej. Celem pracy była ocena znaczenia i regulacji aktywności Nrf2 (i powiązanych z nią procesów zapalnych i oksydacyjnych) w patogenezie zachowań samobójczych oraz depresji poprzez realizację badań przeprowadzonych na tkance ludzkiej mózgu *post mortem* oraz z wykorzystaniem zwierzęcego modelu depresji, którym był model usunięcia opuszek węchowych u myszy. Cele pracy zostały precyzyjnie przedstawione i poprawność ich sformułowania nie budzi wątpliwości.

Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane w kontekście spełnienia założonych celów pracy doktorskiej. Dobór modeli i metod badawczych został przeprowadzony w prawidłowy sposób. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem tkanki ludzkiej mózgu pobranej *post mortem* od ofiar samobójstw oraz zwierzęcego modelu depresji, który stanowiła procedura obustronnego usunięcia opuszek węchowych u myszy. Tkankę mózgową pobrano *post mortem* od 17 ofiar samobójstw (średnia wieku $35,8 \pm 4,3$ lata) oraz od 8 osób stanowiących grupę kontrolną (średnia wieku $34,3 \pm 6$ lat). Zastrzeżenie w tym miejscu budzi brak charakterystyki grupy badanej i kontrolnej np.: informacji o płci i przyczynie śmierci. W pracy w rozdziale Materiały i Metody nie podano również informacji czy osoby z grupy badanej i kontrolnej były leczone z powodu zaburzeń depresyjnych, przewlekłych chorób ośrodkowego układu nerwowego czy innych chorób somatycznych. Badania tkanki mózgowej *post mortem* dotyczyły: analizy poziomów mediatorów stanu zapalnego (IL-1 α , IL-1 β) oraz parametrów stresu oksydacyjnego (TBARS, PCC SOD) w korze czołowej i hipokampie, a także analizy poziomu białek: Nrf2, p-S40-Nrf2, PKC, Keap1, NFkB-p65 w korze czołowej i hipokampie w pełnych

homogenatach i we frakcji cytozolowej i jądrowej tkanki mózgowej ofiar samobójstw w porównaniu do kontroli. Badania na zwierzęcym modelu depresji dotyczyły badań behawioralnych, tj. oceny wpływu procedury usunięcia opuszek węchowych oraz 14-dniowych podań aktywatora czynnika Nrf2 - (R,S)-Sulforafanu na zachowanie zwierząt w teście wolnego pola, teście czynności pielęgnacyjnych „Spalsh Test” oraz aktywności lokomotorycznej. Badania na zwierzęcym modelu depresji dotyczyły również oceny poziomu parametrów biochemicznych stanu zapalnego (IL-10, TNF- α) i stresu oksydacyjnego (TBARS, TAC) w korze czołowej i hipokampie myszy, poziomu parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy myszy, stężenia kortykosteronu w surowicy myszy oraz poziomu białek i mRNA: Nrf2, p-S40-Nrf2, GluN2A, GluN2B, CREB, p-S133-CREB i BDNF w korze czołowej i hipokampie myszy.

Zastosowane w pracy metody zostały bardzo dobrze opisane. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka zastosowała w pracy bardzo szeroki wachlarz metod biochemicznych, w tym metodę ELISA, testy fluorymetryczne, testy kolorymetryczne, metodę Western Blot i metodę Real-Time PCR. Zastosowane metody analizy statystycznej są adekwatne dla rozwiązania problemów badawczych. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w uporządkowany sposób, a właściwie dobrane tabele i wykresy ułatwiają analizę wyników. Do najważniejszych wyników uzyskanych w badaniach w tkance mózgowej pobranej *post mortem* należy wykazanie wzrostu poziomu IL-1 α w korze czołowej i IL-1 β w hipokampie ofiar samobójstw przy jednoczesnym nasileniu stresu oksydacyjnego i zmianach w poziomie białka Nrf2. W korze czołowej (frakcji jądrowej) w grupie ofiar samobójstw, wykazano istotnie obniżony poziom białka Nrf2 przy podwyższonym poziomie białka NF κ B-p65. Do najważniejszych wyników uzyskanych w badaniach w zwierzęcym modelu depresji należy wykazanie, że zabieg usunięcia opuszek węchowych powodował rozwój behawioru pro-depresyjnego u myszy doświadczalnych, czemu towarzyszyło nasilenie stanu zapalnego i zaburzona homeostaza oksydacyjna w strukturach mózgu. Ponadto w modelu usunięcia opuszek węchowych u myszy wykazano, że (R,S)-Sulforafan po podaniach wielokrotnych w dawce 10 mg/kg wykazuje potencjalną aktywność przeciwdepresyjną.

Dyskusja jest napisana w sposób rzeczowy i wnikliwy. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały skonfrontowane z najnowszymi wynikami opublikowanych badań o podobnej tematyce. Dyskusja w pełni ukazuje bardzo dobre

zorientowanie Doktorantki w aktualnej literaturze dotyczącej problematyki badawczej. Wnioski zostały prawidłowo sformułowane w oparciu o omówione wyniki i nie budzą żadnych zastrzeżeń. We wnioskach pracy wskazano na potencjalne zaangażowanie wewnątrzkomórkowego szlaku sygnalizacyjnego zależnego od czynnika Nrf2 w regulację procesów zapalnych i oksydacyjnych ważnych dla zachowań samobójczych i zaburzeń depresyjnych. Ponadto, wyniki pracy pozwoliły na wykazanie po raz pierwszy istotnej roli czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz jego aktywatora (R,S)-Sulforafanu w indukcji efektu przeciwdepresyjnego.

Wnioski Końcowe

Prezentowana praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autorki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego. Wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej, a uwagi przedstawione w recenzji nie umniejszają mojej wysokiej oceny tej pracy. Praca doktorska pt.: „Znaczenie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w patogenezie depresji - badanie roli nuklearnego czynnika transkrypcyjnego Nrf2” w pełni spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego wnoszę o dopuszczenie Pani mgr inż. Patrycji Pańczyszyn-Trzewik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą prowadzonych badań, pragnę złożyć wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

