

Prof. dr hab. Kinga Sałat
Katedra Farmakodynamiki
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum
Uniwersytet Jagielloński
Ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

Kraków, 11.02.2021

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Pańczyszyn-Trzewik pt.
„ZNACZENIE STANU ZAPALNEGO I STRESU OKSYDACYJNEGO W
PATOGENEZIE DEPRESJI – BADANIE ROLI NUKLEARNEGO CZYNNIKA
TRANSKRYPCYJNEGO NRF2”,

wykonanej w Zakładzie Neurobiologii, Pracowni Neurobiologii Pierwiastków Śladowych Instytutu
Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

1. Podstawa formalna opracowania recenzji:

Recenzja została opracowana na zamówienie Dyrektora Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, prof. dr. hab. Władysława Lasonia, na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie z dnia 25 lutego 2020 r.

2. Tematyka rozprawy i uzasadnienie podjęcia tematu badań

Zaburzenia depresyjne (ang. *major depressive disorder*) należą do grupy chorób afektywnych. Szacuje się, iż charakterystyczne dla depresji objawy osiowe - obniżenie nastroju i anhedonia, oraz współwystępujące objawy wtórne (np. zaburzenia snu, lęk, zmęczenie, obniżony napęd psychoruchowy, zaburzenia apetytu, ból psychogeny) dotyczą ok. 4.5% populacji światowej, stanowiąc istotny i wciąż narastający problem medyczny, społeczny i ekonomiczny, określanym mianem choroby cywilizacyjnej XXI wieku.

Depresja to schorzenie mające złożoną etiologię, uwarunkowaną czynnikami zarówno endogennymi, psychologicznymi, czy somatycznymi, a objawy cechuje przewlekły charakter i tendencja do okresowych nawrotów. Wysoka heterogenność objawów, przy jednoczesnym braku swoistych endogennych biomarkerów choroby, sprawia, że diagnoza depresji, zwłaszcza w kontekście możliwych psychiatrycznych schorzeń współistniejących oraz podobieństwa objawów depresyjnych do objawów pojawiających się w przebiegu innych zaburzeń psychicznych, jest niezwykle trudna. Co więcej, leczenie depresji jest procesem długotrwałym, a większość stosowanych obecnie leków przeciwdepresyjnych ma opóźniony początek działania klinicznego i jest skuteczna jedynie u części

pacjentów. Ponadto, część leków przeciwdepresyjnych obarczonych jest bardzo poważnymi działaniami niepożądanymi oraz wykazuje interakcje z innymi stosowanymi jednocześnie lekami, co znacząco ogranicza możliwości farmakoterapii depresji u wielu pacjentów.

Patogeneza depresji nie została do chwili obecnej jednoznacznie zdefiniowana – prowadzone od wielu lat badania naukowe doprowadziły do sformułowania kilku teorii tłumaczących możliwe mechanizmy powstawania tego schorzenia. Do najważniejszych a zarazem najstarszych należą: teoria monoaminergiczna wiążąca powstawanie depresji z deficytem monoamin w mózgu oraz teorie zmian adaptacyjnych gęstości mózgowych receptorów dla neuroprzekaźników i zaburzeń równowagi wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Nowe hipotezy tłumaczące patomechanizmy powstawania depresji kładą silny nacisk na wzajemne interakcje pomiędzy układem nerwowym, immunologicznym i hormonalnym. Badania ostatnich lat wskazują bowiem, iż to właśnie zaburzenia funkcji tych układów (m.in. przewlekły proces zapalny i towarzyszący mu stres oksydacyjny w ośrodkowym układzie nerwowym, zmiany ilościowe i morfologiczne neuronów i komórek glejowych, zaburzenia wydzielania hormonów i nieprawidłowości metaboliczne) mogą być przyczyną i/lub konsekwencją depresji, a stosowana terapia przeciwdepresyjna przywraca prawidłowe funkcje ww. układów. Wydaje się zatem, że zaburzenia depresyjne to wysoce heterogenna grupa schorzeń o zbliżonych objawach psychofizycznych, ale często bardzo zróżnicowanym fenotypie, co istotnie utrudnia diagnozę pacjentów i ich skuteczne leczenie.

Molekularne mechanizmy leżące u podłoża rozwoju depresji nie zostały w pełni poznane, jednak w świetle badań przedklinicznych i klinicznych ostatnich lat, istotną rolę w patogenezie tej choroby przypisuje się stanowi zapalnemu i stresowi oksydacyjnemu. Problematykę związku zaburzeń depresyjnych ze stanem zapalnym w ośrodkowym układzie nerwowym, stresem oksydacyjnym i zmianami w obrębie układu immunologicznego podejmuje rozprawa doktorska mgr inż. Patrycji Pańczyszyn-Trzewik. Praca ta wykonana została pod kierownictwem naukowym prof. dr. hab. Gabrieli Nowaka – promotora pracy oraz dr. hab. Magdaleny Sowa-Kućmy, prof. UR – promotora pomocniczego. Przedstawione w pracy badania były realizowane w ramach projektu PRELUDIUM 12 Narodowego Centrum Nauki, zatytułowanego „Rola aktywacji nuklearnego czynnika transkrypcyjnego Nrf2 indukowanej podaniami (R,S)-sulforafanu w regulacji zachowań typu depresyjnego w modelu usunięcia opuszek węchowych u myszy” (nr projektu: UMO-2016/23/N/NZ4/01337), w którym to projekcie Doktorantka pełniła funkcję Kierownika.

3. Charakterystyka rozprawy

Rozprawa napisana jest w języku polskim, składa się z 11 rozdziałów, w tym spisu literatury, obejmującego 220 pozycji. Spis literatury został zaprezentowany w porządku alfabetycznym, w

przeważającej części zawiera on najnowsze pozycje - 15 polskich, pozostałe w języku angielskim, z szeroko rozumianego zakresu neurobiologii stresu, depresji i zagadnień pokrewnych. Wykaz literatury zredagowany został jednolicie i bez większych błędów.

Całość pracy doktorskiej przedstawiona jest na 115 stronach. Rozprawa ma typowy dla prac doktorskich układ rozdziałów stanowiących logiczną całość; zawiera 25 rycin oraz 10 tabel przedstawiających uzyskane wyniki.

Przed złożeniem rozprawy Doktorantka opublikowała 1 pracę przeglądową z zakresu tematyki rozprawy doktorskiej (rozdział X – Piśmiennictwo, pozycja 138) oraz prezentowała niektóre wyniki swoich badań na kongresie *European College of Neuropsychopharmacology* (rozdział X – Piśmiennictwo, pozycja 137).

Rozprawa doktorska, której autorką jest mgr inż. Patrycja Pańczyszyn-Trzewik rozpoczyna się przedstawionym w porządku alfabetycznym wykazem najważniejszych skrótów używanych w dalszej części pracy. Spis ten znacząco ułatwia analizę rozprawy.

Rozdział pierwszy stanowi wprowadzenie do podjętej w pracy tematyki. Doktorantka przedstawiła w nim przegląd literatury dotyczącej ogólnej charakterystyki zaburzeń depresyjnych – definicję, najważniejsze przyczyny choroby, kluczowe objawy. Opisała etiopatogenezę zaburzeń depresyjnych, koncentrując się na teorii zapalnej tej choroby oraz wywołanych stanem zapalnym i terapią przeciwdepresyjną zmianach aktywności układu immunologicznego. Zaprezentowała również dane literaturowe dotyczące roli stresu oksydacyjnego w patogenezie depresji, wskazując dodatkowo, jak terapia lekami przeciwdepresyjnymi może przywrócić homeostazę w zakresie stanu redoks komórek. We Wstępie, Doktorantka bardzo szczegółowo scharakteryzowała ścieżkę sygnałową nuklearnego czynnika transkrypcyjnego Nrf2, przedstawiając strukturę i najważniejsze funkcje Nrf2, ze szczególnym uwzględnieniem jego roli w mechanizmach odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny i modulacji odpowiedzi organizmu na stan zapalny. Bazując na dostępnych danych przedklinicznych i klinicznych, powiązała możliwe znaczenie zmienionej ekspresji czynnika Nrf2 w patogenezie depresji i efektach farmakologicznych leków przeciwdepresyjnych. W końcowej części rozdziału Doktorantka opisała pochodzenie, właściwości chemiczne, farmakokinetyczne i farmakologiczne sulforafanu – egzogenego aktywatora czynnika Nrf2, koncentrując się na jego możliwym działaniu przeciwdepresyjnym, postulowanym w oparciu o dostępne wyniki badań na modelach zwierzęcych i dane kliniczne pochodzące od pacjentów z zaburzeniami afektywnymi. Wstęp napisany jest w sposób interesujący i przejrzysty; stanowi on bardzo dobre wprowadzenie do dalszej części rozprawy.

W **rozdziale drugim** Doktorantka opisała szczegółowo cel podjęcia badań i uzasadniła dlaczego zdecydowała się podjąć oceny roli czynnika Nrf2 i regulowanych nim procesów w patogenezie depresji. Wskazała, że badania podzieliła na dwie części – pierwsza obejmowała badania *post mortem* na tkance ludzkiej, natomiast druga dotyczyła doświadczeń na modelu zwierzęcym depresji (model usunięcia opuszek węchowych u myszy) – były to badania behawioralne (wybrane testy *in vivo*) oraz analizy biochemiczne *ex vivo*.

W tym miejscu Doktorantka podkreśliła, iż dostępne dane literaturowe wskazują, że modulacja ekspresji i aktywności czynnika Nrf2 to bardzo obiecujący kierunek badań nad depresją i jej terapią. Zatem zgłębienie tego zagadnienia – określenie roli czynnika Nrf2, stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w patogenezie zachowań samobójczych oraz depresji wybrała jako cel badań stanowiących podstawę recenzowanej rozprawy.

W mojej opinii cel ten został sformułowany w sposób przejrzysty, zaplanowane zadania badawcze służące realizacji celu doświadczenia zostały dobrane w sposób logiczny, a dalsza część rozprawy doktorskiej jest konsekwentnym nawiązaniem do postawionej hipotezy badawczej.

W **rozdziale trzecim** Doktorantka przedstawiła dokładny opis metodyki i wykorzystanych do badań materiałów. Część A tego rozdziału rozprawy (badania tkanki ludzkiej *post mortem*) zawiera opis sposobu pobierania tkanki pochodzącej od ofiar samobójstw, przygotowania jej do badań oraz zastosowaną metodykę oznaczeń biochemicznych (oznaczenie poziomu IL-1 α , IL-1 β , produktów peroksydacji lipidów i białek karbonylowanych, białek Nrf2, p-S40-Nrf2, PKC, Keap1, NFkB-p65, analiza aktywności dysmutazy ponadtlenkowej). Część B rozdziału trzeciego rozprawy to opis metodologii badań na modelu mysim. Doktorantka uzasadniła wybór modelu do badań, przedstawiła schemat i warunki przeprowadzenia doświadczeń – scharakteryzowała grupy zwierząt eksperymentalnych, ich pochodzenie, warunki bytowania w laboratorium. Opisała też szczegółowo sposób chirurgicznego usunięcia opuszek węchowych oraz metodykę przeprowadzanych testów behawioralnych – testu wolnego pola, testu czynności pielęgnacyjnych i testu aktywności lokomotorycznej. W tej części rozprawy przedstawiona została też metodyka oznaczeń biochemicznych z wykorzystaniem tkanek (tkanka mózgowa – hipokamp i kora czołowa oraz surowica) pochodzących od zwierząt wykorzystanych w doświadczeniu (oznaczenia poziomu IL-10, TNF α , wybranych markerów stresu oksydacyjnego, kortykosteronu i niektórych białek, m.in. Nrf2, p-S40-Nrf2, GluN2A, GluN2B, CREB, p-S133-CREB i BDNF, jak również analiza poziomu mRNA genów, np. *Bdnf*, *Creb1* i in.).

Rozdział trzeci kończy się opisem wykorzystanych do analizy danych testów statystycznych.

Rozdział czwarty jest rozdziałem kluczowym dla całej rozprawy. Doktorantka opisała w nim uzyskane wyniki badań. Część A tego rozdziału to analiza poziomu mediatorów stanu zapalnego w korze

czołowej i hipokampie samobójców (IL-1 α , IL-1 β , pomiar parametrów stresu oksydacyjnego i stężenia białek, m.in. Nrf2, PKC, Keap1). Poza szczegółowym opisem uzyskanych danych, Doktorantka przedstawiła wyniki badań na rycinach (Ryc. 6-10).

Część B tego rozdziału to wyniki badań na modelu zwierzęcym – Doktorantka oceniła wpływ procedury usunięcia opuszek węchowych i 14-dniowych podań trzech dawek (R,S)-sulforafanu oraz jednej dawki leku referencyjnego – amitryptyliny, na zachowanie zwierząt w testach wolnego pola, czynności pielęgnacyjnych i aktywności lokomotorycznej. Wyniki tych doświadczeń zobrazowała na rycinach (Ryc. 11-15).

W części dotyczącej badań biochemicznych Pani mgr inż. Patrycja Pańczyszyn-Trzewik opisała wpływ procedury usunięcia opuszek węchowych, 14-dniowych podań (R,S)-sulforafanu w dawce 10 mg/kg m.c. i amitryptyliny w tej samej dawce na poziom IL-10 i TNF α , wybrane parametry stresu oksydacyjnego (TBARS, TAC, SOD), poziom kortykosteronu, niektórych białek, w tym Nrf2, p-S40-Nrf2, GluN2A, GluN2B, CREB i BDNF oraz poziom mRNA genów (*Nfe212*, *Grin2a*, *Grin2b*, *Creb1*, *Bdnf*) w korze czołowej, hipokampie i surowicy myszy poddanych bulbektomii. Oprócz szczegółowego opisu, wyniki przedstawiła na rycinach (Ryc. 16-25).

Rozdział piąty stanowi wnikliwa dyskusja wyników uzyskanych badań. Dyskusja podzielona jest na mniejsze podrozdziały, co bardzo ułatwia odnoszenie jej poszczególnych części do uzyskanych i opisanych w poprzednim rozdziale wyników badań. Rozpoczyna się ona krótkim opisem, w którym Doktorantka przytoczyła dane epidemiologiczne dotyczące liczby samobójstw na świecie. Następnie omówiła zaobserwowane w próbkach pochodzących z mózgów samobójców zmiany dotyczące poziomu mediatorów stanu zapalnego, markerów stresu oksydacyjnego i białek ścieżki zależnej od Nrf2. Dane te każdorazowo odniosła do wyników uzyskanych przez innych badaczy.

W dalszej części dyskusji Doktorantka skoncentrowała się na wynikach uzyskanych w badaniach na modelu zwierzęcym. Zanalizowała wnikliwie zaobserwowane zmiany zachowania zwierząt poddanych bulbektomii, oceniła w jaki sposób (R,S)-sulforafan i amitryptylina wpłynęły na obserwowane zjawiska.

Kolejna część rozdziału piątego to szczegółowa interpretacja uzyskanych wyników badań biochemicznych, których celem było zdefiniowanie molekularnego mechanizmu potencjalnego działania przeciwdepresyjnego (R,S)-sulforafanu w modelu zwierzęcym. W tej części Dyskusji Doktorantka skupiła się na wpływie 14-dniowego podawania (R,S)-sulforafanu na poziom markerów zapalenia (cytokin przeciwzapalnych i prozapalnych), stresu oksydacyjnego, kortykosteronu, wybranych białek i mRNA genów w tkankach pobranych od zwierząt doświadczalnych. Podobnie jak wcześniej, wyniki swoich badań odniosła do danych literaturowych.

W mojej opinii Dyskusja prowadzona jest w sposób płynny i logiczny, a wnioski dotyczące uzyskanych rezultatów są poprawne i poparte danymi literaturowymi z ostatnich lat.

Rozdział szósty to krótkie podsumowanie poprzednich dwóch rozdziałów. Analogicznie do rozdziałów IV oraz V został on podzielony na część dotyczącą badań tkanki ludzkiej *post mortem* oraz część dotyczącą badań na modelu zwierzęcym. Podsumowanie zostało przygotowane w zwięzłej i bardzo czytelnej formie opisu uzyskanych wyników, których część Doktorantka zebrała dodatkowo w tabelach (Tab. 5-10).

W rozdziale siódmym Doktorantka przedstawiła wnioski końcowe i najważniejsze osiągnięcia uzyskane w ramach prowadzonych badań.

Rozdziały ósmy i dziewiąty to streszczenia rozprawy doktorskiej w językach polskim i angielskim.

Rozdział dziesiąty to spis piśmiennictwa wykorzystanego w pracy doktorskiej, a **rozdział jedenasty** to spis rycin i tabel zawartych w rozprawie.

4. Najważniejsze osiągnięcia rozprawy

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań, rzetelnie poparte danymi literaturowymi, wskazują, że zarówno stan zapalny, jak i związany z nim stres oksydacyjny należą do kluczowych zjawisk leżących u podłoża depresji i zachowań samobójczych u ludzi, a szlak zależny od czynnika transkrypcyjnego Nrf2 może być zaangażowany w patogenezę depresji. Modulacja szlaku transmisji Keap1-Nrf2 oraz udział kompleksu receptora NMDA są możliwymi mechanizmami tłumaczącymi obserwowaną w modelu zwierzęcym potencjalną aktywność przeciwdepresyjną (R,S)-sulforafanu.

Wnikliwa analiza wyników zaprezentowanych w recenzowanej pracy pozwala określić najważniejsze dokonania naukowe i poznawcze, które w ujęciu ogólnym są następujące:

1. W korze czołowej i hipokampie ofiar samobójstw obserwuje się istotnie statystycznie podwyższone poziomy IL-1, wskazujące na wzmożoną aktywację układu immunologicznego; również niektóre parametry stresu oksydacyjnego są podwyższone w sposób znamieny statystycznie. Oprócz tego obserwuje się zmiany poziomu białek szlaku zależnego od czynnika Nrf2 w tych strukturach. Odmienne poziomy białka Nrf2 w subfrakcjach komórkowych (cytozolowej i jądrowej) mogą wskazywać na istotne znaczenie procesu translokacji cytozoloowo-jądrowej tego białka w patogenezie zachowań samobójczych. Możliwe jest też zaangażowanie szlaku sygnalizacyjnego regulowanego przez Nrf2 w procesy zapalne i oksydacyjne leżące u podłoża rozwoju depresji i zachowań samobójczych.
2. Bulbektomia powoduje wzrost aktywności lokomotorycznej myszy mierzony w teście wolnego pola i teście aktywności lokomotorycznej, natomiast 14-dniowe podawanie dootrzewnowe (R,S)-sulforafanu w dawce 10 mg/kg normalizuje indukowaną zabiegiem

chirurgicznego usunięcia opuszek węchowych hiperaktywność zwierząt. Efekt farmakologiczny tej substancji jest porównywalny do efektu wywołanego analogiczną dawką związku referencyjnego – amitryptyliny.

3. Zabieg bulbektomii negatywnie wpływa na zachowania motywacyjne myszy oceniane w teście czynności pielęgnacyjnych. Obydwa badane związki – (R,S)-sulforafan i amitryptylina (dawka 10 mg/kg m.c., podanie dootrzewnowe przez 14 dni) odwracają efekt zabiegu chirurgicznego obserwowany w tym teście, co potwierdza sugerowaną wcześniej potencjalną aktywność przeciwdepresyjną (R,S)-sulforafanu. Wyniki te wskazują na znaczenie aktywacji szlaku zależnego od Nrf2 w efekcie przeciwdepresyjnym.
4. Indukowanym bulbektomią zachowaniom prodepresyjnym towarzyszy nasilenie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w strukturach mózgu, w tym zmiany poziomu kluczowych dla stanu zapalnego cytokin: IL-10 i TNF α . Wielokrotne podania (R,S)-sulforafanu i amitryptyliny odwracają te zmiany. Podobne zmiany notuje się w zakresie parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy pobranej od zwierząt. Sugeruje to, że potencjalne działanie przeciwdepresyjne (R,S)-sulforafanu w modelu usunięcia opuszek węchowych u myszy może być związane z obniżaniem poziomu TNF α i modulacją niektórych parametrów stresu oksydacyjnego w korze czołowej i hipokampie myszy. To z kolei potwierdza rolę efektu przeciwzapalnego i aktywności antyoksydacyjnej (R,S)-sulforafanu w jego działaniu przeciwdepresyjnym u myszy poddanych bulbektomii.
5. Możliwe jest również zaangażowanie szlaku transmisji Keap1-Nrf2 w aktywność przeciwdepresyjną tego związku i powiązanie tej aktywności z osłabieniem funkcji układu glutaminianergicznego - przede wszystkim z obniżeniem poziomu białka podjednostki GluN2B receptora NMDA w korze czołowej u myszy.

Podsumowując, w przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej eksperymentach, mgr inż. Patrycja Pańczyszyn-Trzewik wykazała, iż stan zapalny i powiązane z nim zjawisko stresu oksydacyjnego są ważnymi czynnikami patogenetycznymi rozwoju depresji a szlak sygnalizacyjny zależny od czynnika Nrf2 jest zaangażowany w regulację tych procesów w depresji. Aktywacja Nrf2 indukowana podaniem (R,S)-sulforafanu może być w przyszłości nowym podejściem terapeutycznym do leczenia depresji.

Moim zdaniem, przedstawione w rozprawie osiągnięcia świadczą o wysokich kompetencjach naukowych Doktorantki.

5. Uwagi do rozprawy

Uwagi o charakterze ogólnym, które są zarówno pytaniami do Doktorantki, komentarzami, jak również uwagami, które wymagają wyjaśnienia:

1. Wstęp:

- Zacytowana na stronie 20 praca autorstwa Bouvier i wsp. (Nrf2-dependent persistent oxidative stress results in stress-induced vulnerability to depression. *Mol Psychiatry*. 2017 Dec;22(12):1701-1713. doi: 10.1038/mp.2016.144) to praca dotycząca badań na szczurzym modelu porażki społecznej – w języku angielskim ‘*social defeat*’, a nie jak pisze Doktorantka ‘*social defect*’.

- W ramach pracy doktorskiej Doktorantka badała działanie farmakologiczne (R,S)-sulforafanu, którego dokładną charakterystykę przedstawiła we Wstępie rozprawy, na stronach 22-26. Czy dostępna literatura wskazuje na istnienie różnic w aktywności chemicznej lub farmakologicznej pomiędzy obydwoma enancjomerami, R-sulforafanem i S-sulforafanem?

2. Materiały i metodyka:

- W części A rozdziału III, na stronie 29, Doktorantka wskazała, że materiał do badań *post mortem* pochodził z Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum i był pobierany w trakcie sądowo-lekarskich sekcji zwłok. Nie wykazała natomiast, czy ten etap badań prowadzony był zgodnie z Zarządzeniem nr 9 Prorektora Uniwersytetu Jagiellońskiego ds. Collegium Medicum z 26 lipca 2019 roku w sprawie: wprowadzenia Regulaminu pobierania tkanek lub/i narządów ze zwłok ludzkich w celach naukowych oraz na potrzeby prowadzenia prac badawczych z zakresu nauk medycznych w trakcie przeprowadzanych sekcji sądowo-lekarskich w Pracowni Ekspertyz Sądowo-Lekarskich Katedry Medycyny Sądowej Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum. Analizując załącznik do tego zarządzenia nasuwa się pytanie, czy wypełnione zostały łącznie wszystkie warunki umożliwiające pobranie materiału, w tym - czy badanie prowadzone było po uzyskaniu zgody właściwej komisji bioetycznej? W tym rozdziale pracy doktorskiej, w części B, Doktorantka zaznacza, że badania na zwierzętach wykonano na podstawie zgody II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie, wyrażonej Uchwałą nr 231/2017, brak natomiast analogicznej informacji dotyczącej zgody Komisji Bioetycznej UJ na badania tkanek ludzkich *post mortem*.

- W rozdziale III pracy zabrakło też bardziej szczegółowej informacji dotyczącej grupy kontrolnej użytej w badaniach *post mortem* (np. przyczyna zgonu).

- W rozdziale III, w podrozdziale 2.1.2, str. 34, wskazano, że badania na modelu zwierzęcym prowadzono w warunkach bez wzbogacenia środowiska. Doktorantka zaznacza, że wzbogacenie

środowiska mogłoby wpłynąć na końcowy wynik doświadczenia i uniemożliwiłoby weryfikację poprawności jego przeprowadzenia. Szkoda, że nie rozwinęła tej myśli, ewentualnie cytując literaturę potwierdzającą zasadność niestosowania elementów wzbogacających w warunkach prowadzonego doświadczenia. Stąd moja prośba o komentarz w tej kwestii.

- Rozdział III, podrozdział 2.1.3, str. 35 - po zakończeniu operacji zwierzęta otrzymywały podskórnie Metacam jako środek przeciwbólowy i przeciwzapalny. Metacam to nazwa firmowa leku o nazwie meloksykam, a nie jak pisze Doktorantka metoksyny.

- Podanie badanych związków. Co było powodem nieuwzględnienia w schemacie eksperymentu podania jednorazowego (R,S)-sulforafanu - dlaczego Doktorantka zdecydowała się tylko na podanie 14-dniowe testowanych substancji? Czy są jakieś dane literaturowe wskazujące że sulforafan wykazuje (lub nie) aktywność po podaniu jednorazowym?

- Czy Doktorantka może wyjaśnić, dlaczego w schemacie doświadczenia zaplanowała porównania wyłącznie w obrębie grupy myszy poddanych operacji pozorowanej (*sham*) i myszy poddanych zabiegowi chirurgicznego usunięcia opuszek węchowych? Czy zasadnym byłoby zwalidować użyty model poprzez uwzględnienie dodatkowej grupy kontrolnej, nie poddawanej operacji pozorowanej, tak, aby wykluczyć ewentualne rozbieżności wynikające z samego zabiegu chirurgicznego?

(Lit.: de Almeida RF, Pocharski CB, Rodrigues ALS, Elisabetsky E, Souza DO. Guanosine fast onset antidepressant-like effects in the olfactory bulbectomy mice model. *Sci Rep.* 2020 May 21;10(1):8429. doi: 10.1038/s41598-020-65300-w)

- Analiza statystyczna wyników – Doktorantka wskazała, że w części B pracy do analizy statystycznej użyła jednoczynnikowej analizy wariancji oraz testu *post hoc* Bonferroniego, podczas gdy w rozdziale IV, na stronach 50 (Ryc. 11) i 52 (Ryc. 13) napisała, że dane analizowała za pomocą testu t-Studenta.

3. Wyniki – w tej części pracy należałoby doprecyzować opis niektórych uzyskanych rezultatów:

- Str. 45 i 46 - w tekście brak odniesienia do Ryc. 8B, C, E, F, H, I, J.

- Str. 46 - brak odniesienia w tekście do Ryc. 9B, D, G oraz do Ryc. 10.

- Str. 52: Doktorantka napisała, że „zabieg usunięcia opuszek węchowych spowodował u myszy istotne wydłużenie latencji oraz znamienne obniżenie liczby i czasu podejmowanych czynności pielęgnacyjnych”. Wskazuje, że wyniki te zaprezentowała na Ryc. 14. Te wyniki raczej przedstawiono na Ryc. 13A-C, natomiast Ryc. 14 dotyczy drugiego punktu czasowego, w którym wykonano test czynności pielęgnacyjnych – po podaniu badanych związków.

- Str. 56 - w tekście brak odniesienia do Ryc. 17D

- W tekście brak odniesienia do Ryc. 25.

- W niektórych miejscach rozprawy Doktorantka odnosi się w opisie wyników do rezultatów nieznamiennych statystycznie (np. na str. 61), podczas gdy w innych miejscach nie robi tego (np. str. 43 - Ryc. 6B, str. 56 – Ryc. 17D).

4. Dyskusja:

- Dyskusja jest prowadzona w sposób wnikliwy, chociaż zabrakło w niej wyjaśnienia, dlaczego w badaniach behawioralnych użyto testu czynności pielęgnacyjnych a nie na przykład testu wymuszonego pływania, czy testu zawieszenia za ogon.

Drobne uwagi redakcyjne

Pragnę zaznaczyć, że poniższe uwagi redakcyjne nie mają istotnego wpływu na ocenę merytoryczną pracy i nie komplikują jej odbioru.

- Opis Ryc. 21 na str. 62 – niepotrzebny symbol $p < 0.05$; podobnie w opisie Ryc. 22 - symbol $p < 0.01$ jest zbędny.

- Na str. 63 – opis „Analiza Real-Time PCR nie wykazała istotnych zmian w poziomie mRNA genów... w hipokampie...” – opis dotyczy Ryc. 24A-E (a nie 23A-E).

- Opis pod Ryc. 23 - zbędne są symbole $p < 0.01$, $p < 0.05$ i $p < 0.01$, natomiast brak uwzględnienia symbolu $p < 0.001$; z kolei w opisie Ryc. 24 niepotrzebnie wprowadzono symbole: $p < 0.01$, $p < 0.01$.

- Opis na str. 63-64 i Ryc. 23 - poziom mRNA genu *Grin2b* w korze czołowej pokazano na Ryc. 23C a nie 23B, podobnie na Ryc. 24 - poziom mRNA genu *Grin 2b* pokazano na panelu C, a nie jak pisze Doktorantka na panelu B.

- Praca napisana jest poprawnym językiem, jedynie w niektórych miejscach pojawiają się błędy literowe (np. str. 3, 4, 6, 7, 9, 14, 16, 20, 25, 31, 33, 34, 36, 40, 42, 56, 67, 73-77, 79, 81, 84, 92, 93).

- Dyskutując wyniki zawarte w rozprawie doktorskiej Doktorantka wielokrotnie używa sformułowań takich jak „nasze badania”, „badania wykonane przez nas”, „nasze doświadczenia”, itp. Mając świadomość, iż prowadzone obecnie badania farmakologiczne są badaniami interdyscyplinarnymi, w których prowadzenie zaangażowane są całe zespoły badawcze i niemożliwym byłoby wykonanie ich przez jedną osobę, recenzent zauważa, iż w rozprawie doktorskiej, dla podkreślenia istotnego wkładu pracy Doktorantki, bardziej właściwe byłoby używanie formy bezosobowej, np. „badania wykazały”, „wyniki przeprowadzonych badań wskazują na...”, „wyniki przeprowadzonych doświadczeń”, itp.

- Skrót wyjaśniony przy pierwszym użyciu powinny być konsekwentnie używane w dalszych częściach pracy, np. na str. 22 – SFN, a w kolejnych rozdziałach pojawia się pełna nazwa – sulforafan; na str. 75 „OB”, a dalej – na str. 76 „usunięcie opuszek węchowych”; str. 80 – „CORT” a dalej

„kortykosteron”, str. 87 - wyjaśnienie skrótów TAC i SOD, które już wcześniej były używane i objaśniane.

- Termin „układ glutaminergiczny” (str. 83) – poprawnym terminem jest „układ glutaminianergiczny” (w którym przekaźnikiem jest glutaminian).

- Tytuły tabel powinny znajdować się nad tabelami a nie pod nimi.

6. Ogólna ocena rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, której autorką jest mgr inż. Patrycja Pańczyszyn-Trzewik skupia się na bardzo interesującym zagadaniu naukowym jakim jest związek depresji ze stanem zapalnym, stresem oksydacyjnym oraz szlakiem zależnym od czynnika transkrypcyjnego Nrf2. W mojej ocenie badania są ciekawe, szczególnie z uwagi na połączenie wyników badań na tkance ludzkiej z badaniami w modelu zwierzęcym. Są one ważne nie tylko z naukowego, ale i potencjalnie użytecznego punktu widzenia, ponieważ wskazują na możliwe wykorzystanie uzyskanych wyników do dalszych badań przyczyn powstawania zaburzeń depresyjnych. Mogą też być pomocne w wytyczaniu kierunków poszukiwania nowych leków przeciwdepresyjnych.

Cele założone na wstępie pracy były konsekwentnie realizowane i w mojej ocenie zostały osiągnięte. Doświadczenie Doktorantki w zakresie wykorzystania różnych metod badawczych, szczególnie testów behawioralnych i analiz biochemicznych, wskazują jednoznacznie na Jej zaawansowaną wiedzę dotyczącą tematyki opisanej w pracy. Na podkreślenie zasługuje fakt logicznego zaplanowania zestawu doświadczeń, które pozwoliły zweryfikować postawione hipotezy badawcze. Rozprawa wnosi istotny wkład naukowy w problematykę patogenezy depresji, a Doktorantka wykazała się nie tylko praktyczną umiejętnością prowadzenia badań naukowych, ale i zdolnością wnikliwej dyskusji dotyczącej różnych aspektów powstawania zaburzeń depresyjnych.

Podsumowując, uważam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska, której autorką jest mgr inż. Patrycja Pańczyszyn-Trzewik spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Dlatego stawiam wniosek o przyjęcie i dopuszczenie przez Radę Naukową Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie pracy doktorskiej mgr inż. Patrycji Pańczyszyn-Trzewik do publicznej obrony.

Jednocześnie, z uwagi na rangę podjętej tematyki, kompetencje Doktorantki, nowatorski charakter prowadzonych badań, umiejętność prowadzenia interesującej dyskusji oraz znaczenie uzyskanych wyników dla rozwoju badań nad depresją, zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja PAN w Krakowie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Pańczyszyn-Trzewik zatytułowanej „Znaczenie stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w patogenezie depresji – badanie roli nuklearnego czynnika transkrypcyjnego

Nrf2", wykonanej pod kierownictwem naukowym Promotora, Pana prof. dr. hab. Gabriela Nowaka i Promotora pomocniczego, Pani dr hab. Magdaleny Sowa-Kućmy.

Kinga Satał