Prof. dr hab. Krystyna Koziec
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt **" Immunohistochemiczna ocena hipokampalnych interneuronów GABAergicznych w eksperymentalnych modelach depresji"**
wykonanej przez **mgr Barbarę Nowak**
w Zakładzie Cytobiologii Katedry Farmakobiologii,
Wydziału Farmaceutycznego
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
pod kierunkiem promotora **Pana dr hab. Tadeusza Librowskiego, prof. UJ**
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest monografią składającą się z rozdziałów ułożonych wg wymaganego porządku dla tego typu opracowań: Wstępu (42 strony), Celu (1 strona), Materiałów i Metod (13 stron), Wyników i dyskusji (93 strony), Wniosków (9 stron), Aneksu (35 rycin), Piśmiennictwa (251 publikacji i opracowań naukowych). Łącznie rozprawa ma 215 stron, zawiera 83 ryciny oraz 11 tabel.

Zgodnie z obowiązującym prawem rozprawa doktorska powinna prezentować ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Natomiast przedmiotem rozprawy doktorskiej ma być oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej.

Ponieważ prezentowane w rozprawie doktorskiej wyniki i ich omówienie dotyczą tylko jednego modelu depresji (bulbektomii), nie biorę pod uwagę wyników uzyskanych w innych doświadczeniach z modelami depresji: chronicznym nieprzewidywalnym stresie oraz chronicznym umiarkowanym stresie. Nie ocenię także poprawności tych wyników pomimo oświadczenia Doktorantki, że zostały już opublikowane w pracach:

Zadrożna M, Nowak B, Łasoń-Tyburkiewicz M, et al. Different pattern of changes in calcium binding proteins immunoreactivity in the medial prefrontal cortex of rats exposed to stress models of depression. Pharmacol Rep. 2011;63(6):1539-1546. doi:10.1016/s1734-1140(11)70718-6 oraz

Nowak B, Zadrożna M, Ossowska G, et al. Alterations in hippocampal calcium-binding neurons induced by stress models of depression: a preliminary assessment. Pharmacol Rep.2010;62(6):1204-1210. doi:10.1016/s1734-1140(10)70383-2;

ze względu na: 1/prace te nie dotyczą bezpośrednio tematu rozprawy doktorskiej; 2/przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma charakter monografii, a nie jest połączeniem monografii i oryginalnych publikacji (jedna z nich dotyczy innej struktury mózgowia); 3/ Doktorantka nie wykazała wkładu własnego i innych autorów w powstanie tych prac; 4/nie dołączono do rozprawy kopii tych prac. Na podstawie powyższych faktów wyniki te nie mogą być uznane za „oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej" i nie powinny być przedmiotem dyskusji nad rozprawą doktorską. Natomiast podkreślam, że uzyskane wyniki oraz wnioski z tych wczesnych prac umożliwiły Doktorantce właściwe przeprowadzenie trzeciego eksperymentu dyskutowanego w rozprawie doktorskiej i wykazanie naukowej istotności uzyskanych wyników.

Dlatego też uważam, że zgodnie z zapisami ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne, a wyniki w niej prezentowane istotnie poszerzają wiedzę o roli hipokampalnych interneuronów GABAergicznych oraz amitryptyliny w modulowaniu objawów depresji.

Ocena merytoryczna celu i etapów realizacji pracy doktorskiej

Według Światowej Organizacji Zdrowia depresja stanowi główną przyczynę niesprawności i niezdolności do pracy na świecie, jest także najczęściej spotykanym zaburzeniem psychicznym. Niestety, ponad połowa przypadków depresji pozostaje nierozpoznana, a spośród osób z diagnozowaną depresją jedynie połowa otrzymuje właściwe leczenie. Z tego względu niezwykle ważną kwestią jest znajomość natury i objawów depresji oraz podstaw jej diagnostyki i leczenia. Liczne badania wykazały, że depresja jest efektem współdziałania różnych czynników występujących równolegle lub sekwencyjnie. Na szczególną uwagę zasługują czynniki biologiczne takie jak czynniki genetyczne, zmiany poziomu neuroprzekaźników w mózgu, stan zdrowia somatycznego, choroby przewlekłe, uzależnienia. Ze względu na różne przyczyny depresji, a także mnogość

objawów, utrudnione jest diagnozowanie choroby oraz opracowanie metod jej leczenia. Odpowiednia farmakoterapia powinna być dobrana do przyczyn i objawów depresji występujących u chorego. Jednak pomimo wielu interdyscyplinarnych badań wciąż trudno jest jednoznacznie określić zmiany w strukturach mózgowia, fizjologicznym działaniu neuronów i odpowiednich neurotransmiterów podczas depresji.

W obszernym i szczegółowym Wstępie Doktorantka przedstawiła najnowszą wiedzę dotyczącą fizjologicznej aktywności hipokampa, przyczyn rozwoju i przebiegu depresji oraz scharakteryzowała amitryptylinę, lek stosowany w leczeniu depresji. Pani mgr Nowak zwróciła uwagę na wciąż mało poznaną rolę układu GABAergicznego w przebiegu depresji ze szczególnym uwzględnieniem interneuronów mających wpływ na hipokampalne komórki główne.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska miała na celu wyjaśnienie roli interneuronów układu GABAergicznego w regulacji eksperymentalnie wywołanego stanu depresji przy zastosowaniu bulbektomii opuszek węchowych (OB). Ponadto, zakładano weryfikację tezy o odmiennym wzorcu wrażliwości i funkcjonowania układu GABA-ergicznego w dorsalnej i wentralnej części formacji hipokampa, oraz badanie wpływu leku antydepresyjnego, amitryptyliny, na zmiany zaistniałe w obrębie układu GABAergicznego w następstwie procedur eksperymentalnych.

Badanym składnikiem układu GABAergicznego były hipokampalne interneurony zawierające kalbindynę, parwalbuminę i kalretyninę, odpowiedzialne za inhibicję komórek głównych i synchronizację pracy innych interneuronów.

Realizacja założonego celu była możliwa dzięki szerokiej wiedzy mgr Anny Nowak o eksperymentalnych procedurach wywołania depresji, a także wcześniej uzyskanych wynikach dotyczących: szczegółowej gęstości numerycznej komórek reaktywnych immunohistochemicznie we wszystkich subregionach formacji hipokampa; zróżnicowanej dystrybucji i gęstości numerycznej komórek reaktywnych immunohistochemicznie w osi septalno-temporalnej oraz dorsalno-wentralnej formacji hipokampa; gęstości optycznej produktu immunoreakcji w ciałach komórkowych neuronów i w neuropilu.

Opiniując cel, hipotezy badawcze oraz zadania badawcze uważam, że zostały one prawidłowo zaplanowane i potwierdzają ogólną wiedzę Doktorantki ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Ocena procedur oraz metod zastosowanych podczas realizacji doświadczeń

Realizację założonych celów pracy prowadzono w doświadczeniu (bulbektomia opuszek węchowych) wykonanym w Instytucie Farmakologii Polskiej Akademii Nauk. Doświadczenie wykonano na 24 dojrzałych samcach szczurów Wistar po uzyskaniu zgody LKE właściwej dla miejsca wykonywania eksperymentu (nie podano numeru zgody).

Niestety opis doświadczenia jest niepełny, a odsyłanie do Wstępu z adnotacją: „wg procedur przedstawionych powyżej" (bez podania właściwej strony) w celu dokładnego poznania procedury jest niewłaściwe, tym bardziej, że opis jest nieprecyzyjny. Zakładając, że Doktorantka samodzielnie wykonywała eksperyment, wymagane jest podanie dokładnego opisu przebiegu doświadczenia.

Na pozytywną ocenę tej części rozprawy wpłynęła logiczna argumentacja wyboru takiej procedury przedstawiona przez Doktorantkę w sposób potwierdzający Jej wiedzę w tym zakresie. Ponadto, Pani mgr Nowak podała dokładny opis metodyk użytych w doświadczeniach-metod histologicznych, histochemicznych z wykorzystaniem technik Nissla, PAS, i trójchromatycznej Massona-Goldnera, oraz immunohistochemicznych z zastosowaniem przeciwciał dla kalbindyny, kalretyniny, parwalbuminy, GFAP, Bax; Bcl2.

Pobrane skrawki tkankowe, dla OB osobno z trzech części hipokampa: dorsalnego (z bieguna septalnego), pośredniego, i wentralnego (z bieguna temporalnego) zostały odpowiednio wybarwione. Następnie oceniano gęstość numeryczną interneuronów (pomiary morfometryczne) oraz nasilenie immunoreaktywności (pomiary densytometryczne gęstości optycznej produktu reakcji). Do dokładnej oceny morfologicznej i histologicznej struktur mózgowia użyto odpowiednich metod immunohistochemicznych i histologicznych.

Ocena uzyskanych wyników, ich interpretacji oraz wniosków

Bulbektomia stosowana jako model depresji opiera się na utracie zmysłu węchu, który prowadzi do rozwoju zachowania zwierząt charakterystycznego dla depresji. Analiza morfologiczna i morfometryczna tkanek hipokampów zwierząt po usunięciu opuszek węchowych wskazała, że lokalne zmiany degeneracyjne tkanki charakterystyczne są dla wielu chorób neurodegeneracyjnych nie tylko dla depresji. Degeneracja neuronów w tkance hipokampa miała różne nasilenie, najsilniejsze zmiany obserwowano w dorsalnych i wentralnych częściach szczurzego hipokampa. Stwierdzono, że zmiany degeneracyjne obserwowane w dystalnym CA1 były efektem apoptozy lub atrofii neuronów, natomiast

w CA3 dominowały neurofibrylarne zmiany degeneracyjne, zachwianie równowagi osmoregulacyjnej i pęcznienie neuronów. Doktorantka słusznie mogła sugerować, że zmiany degeneracyjne mogły mieć wpływ na zaburzenia zachowania szczurów.

Wykazano także, iż interneurony z ekspresją trzech rodzajów białek wiążących wapń (kalbindyny, kalretyniny, i parwalbuminy) nakładają się na siebie i wykazują częściową kolokalizację ekspresji białek wiążących. Stwierdzono także zróżnicowaną reakcję neuronów na bulbektomię, która doprowadziła do istotnej utraty badanych populacji interneuronów obserwowaną tylko w przypadku degeneracji neuronów.

Traktowanie szczurów amitryptyliną wywołało modulację ekspresji białek wiążących wapń w neuronach, co prawdopodobnie mogło przyczynić się odmiennej reakcji interneuronów. Uzyskane wyniki wykazały także zwiększoną immunoreaktywność perineuronalną w warstwie komórek głównych potwierdzając neurotroficzne właściwości amitryptyliny.

Oceniając przedstawienie i dyskusję uzyskanych wyników stwierdzam, że rozprawa wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę.

Na podstawie wyników przedstawionych w monografii Doktorantka sformułowała szczegółowe stwierdzenia dla eksperymentu, które są bardziej podsumowaniem uzyskanych wyników niż wnioskami.

W 10 ogólnych stwierdzeniach mgr Nowak streściła uzyskane wyniki, tylko jeden z nich jest wnioskiem: „Wybitna zmienność badanego materiału tkankowego oczywiście może wynikać z indywidualnej reakcji organizmu na procedury eksperymentalne bezpośrednio, lub na procesy zapalne rozwijane następczo w tkance mózgowej, na tle zróżnicowanie genetycznego lub/i epigenetycznego. W pewnym stopniu to zróżnicowanie może wynikać także z precyzji wykonanych operacji. Ten aspekt należy bardzo starannie uwzględniać w podobnych badaniach".

Ponadto, Doktorantka oddzielnie podsumowała wyniki dotyczące zmian w interneuronach wykazujących ekspresję trzech różnych białek i wśród nich najważniejszymi wnioskami/osiągnięciami mogą być:

1. Niezależnie od warunków doświadczenia, wzdłuż osi dorsalno-wentralnej następował wzrost liczebności interneuronów kalbindynowych, istotne statystycznie różnice często obserwowano między poziomem dorsalnym, a pośrednim hipokampa.

2. Przeciwstawne wyniki otrzymane w analizie neuronów CB+ i CR+, tj. odpowiednio wzrost i spadek liczebności neuronów w niektórych rejonach hipokampa pod wpływem traktowania amitryptyliną zyskują racjonalność w świetle unikalnego mechanizmu działania tego leku.
3. Zagęszczenie sieci neurytów wokół komórek głównych oraz presynaptyczna strukturalna plastyczność (zwiększanie liczby połączeń synaptycznych) pod wpływem amitryptyliny wystąpiły w obszarach hipokampa najbardziej narażonych na procesy degeneracyjne w warunkach tego doświadczenia i mogło to mieć związek z neurotroficznymi właściwościami zastosowanego leku.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na kilka elementów, które mogłyby udoskonalić pracę nad rolą układu GABAergicznego w modelu depresji.

1. Dokładny opis procedur badawczych powinien być umieszczony w rozdziale Materiały i Metody.
2. Należy szerzej uzasadnić rolę amitryptyliny w modulacji aktywności neuronów.
3. Niezbędna jest poprawa błędów gramatycznych, interpunkcyjnych (po tytule nie powinna być kropka).
4. Unikać zamiennego używania terminów „liczność" i liczebność".

Podsumowanie

Uwagi zamieszczone w powyższej opinii nie umniejszają pozytywnej oceny uzyskanych wyników, ich dyskusji i sposobu przedstawienia na wykresach i dobrze opracowanych fotografiach poszczególnych struktur hipokampa. Przedstawienie wyników oraz ich przedyskutowanie odpowiadają tematowi rozprawy doktorskiej, jej celom i wskazują na potencjalną przydatność uzyskanych wyników dla specjalistów zajmujących się badaniem depresji.

Ponadto, podjęcie przez Doktorantkę próby zmierzenia się z tak trudnym problemem jakim było określenie roli amitryptyliny w modulowaniu zmian neuronów wywołanych procedurą bulbektomii uważam za ważne, celowe i mogące przyczynić się do rozwoju nauk farmaceutycznych.

Wniosek końcowy

Uważam, że oceniana praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim 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 2016r. poz. 882 z późn. zm.), w związku z art. 179 ust.1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r.poz.1669) oraz w paragrafie 6 ust. 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Dlatego też zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki farmaceutyczne UJ w Uniwersytecie Jagiellońskim-Collegium Medicum z prośbą o dopuszczenie Pani mgr Anny Nowak do dalszych etapów przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim wszczętym w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Krystyna Koziec

Kraków 26.11.2023r.