

Ocena pracy doktorskiej mgr Anny Rafała-Ulińskiej

pt.: „Zmiany w poziomie ekspresji genów oraz białek transporterów cynkowych w depresji”.

Według Światowej Organizacji Zdrowia na depresję, schorzenie coraz bardziej rozpowszechniające się we współczesnym świecie, choruje obecnie ponad 300-350 milionów ludzi na świecie, dotykając nie tylko pacjentów, ale i ich rodziny. Niestety pomimo intensywnych badań etiologia i patofizjologia tej choroby wciąż wymaga dalszych intensywnych badań. W ostatnich latach wyniki badań zarówno farmakologicznych jak i klinicznych i epidemiologicznych zwróciły uwagę na istotną rolę cynku w depresji. Niewątpliwie duże znaczenie mają tutaj prace prof. dr hab. Gabriela Nowaka oraz dr hab. Bernadety Szewczyk z Instytutu Farmakologii PAN, odpowiednio promotora i promotora pomocniczego Doktorantki, których logiczną kontynuacją są badania Doktorantki mgr Anny Rafała-Ulińskiej. Biorąc powyższe pod uwagę tematyka przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej jest zarówno aktualna jak i celowa.

Rozprawa doktorska mgr Anny Rafała-Ulińskiej składa się z typowych rozdziałów. Logiczny układ pracy, poprawny styl, prawidłowe cytowanie literatury (176 pozycji), a także przedstawienie i omówienie wyników wskazują na dobrze opanowaną przez Doktorantkę umiejętność pracy naukowej. Nowatorstwo przedstawionej mi do oceny pracy związane jest między innymi z faktem, że aż 84% pozycji literaturowej pochodzi z tego wieku, 14% z lat 1990-1999, a tylko 2% zostało opublikowane przed 1990 r. Pragnę podkreślić, że część uwzględnionych w rozprawie doktorskiej wyników została zamieszczona w 2 pracach opublikowanych w renomowanych międzynarodowych czasopismach Journal of Psychiatric Research oraz Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry o łącznym Impact Factor 8,2 punktów. Pierwszym autorem obydwu prac jest przy tym Doktorantka, co niewątpliwie świadczy o jej wiodącej roli w realizacji niniejszego projektu.

We wstępie mgr Rafała-Ulińska w bardzo ciekawy i przystępny sposób wprowadza czytelnika w tematykę pracy. Co ważne, znajduje się w nim wyjaśnienie wszystkich podstawowych pojęć patofizjologicznych oraz farmakologicznych niezbędnych do zrozumienia dalszych części pracy, a poza tym wyraźne uzasadnienie celu podjętych badań. Przedstawione są w nim najważniejsze dane epidemiologiczne związane z depresją, aktualne poglądy na neurobiologię zaburzeń depresyjnych,

a także w skrócie farmakologiczna i nefarmakologiczna terapia depresji. Czy dieta może być jednym ze sposobów nefarmakologicznej terapii depresji? Ze zrozumiałych względów najszerzej przedstawione jest znaczenie i utrzymanie homeostazy cynku w fizjologii oraz jego rola w patofizjologii i terapii depresji. Szczegółowo omówieni są przy tym główni bohaterowie niniejszej pracy transportery cynkowe, w tym przede wszystkim odpowiedzialne za obniżenie stężenie jonów Zn^{2+} w cytoplazmie transportery ZnT. Uzasadnienie wyboru określonych transporterów cynku do badań znajdujemy w dyskusji pracy. We wstępie zabrakło mi jedynie przybliżenia modelu usunięcia opuszek węchowych, co ułatwiłoby szybkie zrozumienie pierwszego celu „zbadanie wpływu usunięcia opuszek węchowych...”. Model ten został szczegółowo przedstawiony i uzasadniony w dyskusji. Pewnym utrudnieniem w czytaniu pracy jest niekonsekwentne wyjaśnianie skrótów przy ich pierwszym wprowadzaniu np. LPD (leki przeciwdepresyjne – 1-sze pojawienie się na stronie 3, wyjaśnienie na str. 4; Hp czy PFC - 1-sze pojawienie się na stronie 1, wyjaśnienie na str. 19), wprowadzenie w metodyce skrótu AMI bez uprzedniego wyjaśnienia. Oczywiście wyjaśnienia tych skrótów można było znaleźć w umieszczonym na początku pracy ich spisie. Wyjątkiem jest skrót testu TST, którego nie ma w spisie.

Doktorantka postanowiła zbadać potencjalną rolę szeregu transporterów ZnT (poziom ekspresji jego mRNA oraz białka) w dwóch strukturach mózgu korze przedczołowej (PFC) i hipokampie (Hp) zarówno w dwóch modelach zwierzęcych (1) depresji agitowanej wywołanej usunięciem opuszek węchowych oraz (2) niedoboru cynku (w obydwu przypadkach w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem chronicznego podawania amitryptyliny), a także w bardzo cennym materiale pochodzącym od osób ze zdiagnozowaną depresją oraz ofiar samobójstwa. Całość umożliwiło kompleksową, zawartą w tytule niniejszej pracy doktorskiej ocenę zmiany w poziomie ekspresji genów oraz białek transporterów cynkowych w depresji. Wydaje mi się, że pierwszy i drugi cel wymaga trochę bardziej precyzyjnego sformułowania, gdyż w obecnej formie druga część każdego z tych celów są identyczne „zbadanie wpływu chronicznych podań amitryptyliny na poziom ekspresji mRNA oraz białka ZnT w mózgu szczurów”. Może bardziej klarowne sformułowanie celów byłoby możliwe dzięki połączeniu metod np.

1. Zbadanie wpływu usunięcia opuszek węchowych i diety niskocynkowej na poziom ekspresji mRNA oraz białka ZnT w mózgu szczurów.

2. Zbadanie wpływu chronicznych podań amitryptyliny na poziom ekspresji mRNA oraz białka ZnT w mózgu szczurów w modelu usunięcia opuszek węchowych i diety niskocynkowej.

Materiał i metody są bardzo szczegółowo opisane, a dodatkowo zilustrowane pomocnymi schematami doświadczeń chronicznych oraz tabelami zawierającymi spis używanych przeciwciał oraz bardzo dokładną charakterystykę osób (w tym odpowiednich grup kontrolnych), od których pobrano tkanki do badań. Jedynie pomyłkowo napisano, że charakterystyka demograficzna osób psychicznie chorych oraz ofiar samobójstw została zamieszczona w Tabeli 4, a nie 5 jak jest prawidłowo.

Wyniki zostały przedstawione na 16 złożonych, szczegółowo opisanych rycinach i opracowane za pomocą odpowiednich testów statystycznych. Omyłkowo zostały jedynie ponumerowane i zacytowane w tekście wyników dwie ostatnie ryciny (21, 19). Wśród wyników, oprócz zasadniczych danych biochemicznych, znajdują się też bardzo ważne wyniki testów behawioralnych: (1) wpływ usunięcia opuszek węchowych oraz chronicznego podania amitryptyliny na ruchliwość szczurów w teście wolnego pola, które umożliwiły potwierdzenie poprawności usunięcia opuszek węchowych oraz chronicznego podawania amitryptyliny; (2) testy wymuszonego pływania i ocena aktywności lokomotorycznej pozwalające na ocenę pro-depresyjnego behawioru. Ponadto zasadność stosowania w zasadniczych badaniach oceniających ekspresję transporterów ZnT diety o zmniejszonej zawartości cynku przez 6, a nie przez 4 tygodnie została wykazana dzięki ocenie (za pomocą fluorescencyjnego barwienia z użyciem odpowiedniego znacznika) wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Zn^{2+} w korze przedczołowej i hipokampie.

Na uwagę zasługuje niewątpliwie fakt, że najwięcej zmian w poziomie ZnT zanotowano na materiale pochodzącym od człowieka. W PFC i hipokampie pochodzącym zarówno od ofiar samobójstw jak i pacjentów ze zdiagnozowaną depresją (MDD; oceniano jedynie PFC) stwierdzono wzrost ZnT1 i ZnT4, ponadto w PFC, ale nie w hipokampie zaobserwowano wzrost poziomu ZnT5, ale spadek ZnT3, a w tkankach pobranych od ofiar samobójstw, ale nie MDD, zanotowano ponadto wzrost ZnT6. Podobną tendencję zmian, ale jedynie w przypadku ZnT1 i ZnT3 zaobserwowano u szczurów po bulbektomii, czyli odpowiednio wzrost (PFC i Hp) oraz spadek (PFC). Jak słusznie zauważa Doktorantka, ponieważ powyższe zmiany zachodziły jedynie na poziomie białka, a nie mRNA, sugeruje to posttranslacyjne mechanizmy regulujące poziom transporterów ZnT w modelu OB. Natomiast dieta

niskocynkowa indukowała analogiczne zmiany w poziomie transporterów cynkowych zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Jednak, co ciekawe, były one przeciwstawne w PFC i Hp. I tak wspomniany powyżej wzrost poziomu ZnT1 i ZnT4 występował jedynie w Hp (w przypadku ZnT4 jedynie na poziomie mRNA), a spadek poziomu ZnT3 jedynie w PFC. Natomiast w PFC zanotowano spadek ZnT1, a w Hp wzrost mRNA dla ZnT3.

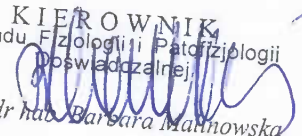
W obydwu modelach zwierzęcych Doktorantka zaobserwowała jedynie niewielki wpływ chronicznego podania amitryptyliny na poziom ZnT (odwrócenie zmian w poziomie ZnT1 w PFC szczurów po bulbektomii), co jak słusznie zauważa w dyskusji, sugeruje, że działanie tego leku nie wiąże się ze zmianami w poziomie transporterów. Co ciekawe amitryptylina obniżała poziom mRNA dla ZnT4 i ZnT5 w PFC oraz ZnT1, ZnT3 i ZnT4 w Hp szczurów kontrolnych (pozornie operowanych), a nie otrzymujących paszę z prawidłową zawartością cynku. Powstaje pytanie, jak można to wytłumaczyć?

Rozdział VI rozprawy doktorskiej stanowi wspólne podsumowanie wyników i wnioski, oddzielne dla każdego modelu badawczego. Jak słusznie podsumowuje Doktorantka, przeprowadzone przez nią badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych depresji jak również tkanek pochodzących od człowieka wskazują, że patofizjologia depresji jest związana ze zmianami w poziomie transporterów cynkowych w sposób zależny od struktury mózgu i niewątpliwie wymaga dalszych badań. Nie ukrywam, że zarówno w dyskusji jak i w podsumowaniu trochę brakuje mi bardziej ogólnego, niezależnego od modelu podejścia Doktorantki. Końcowe, wspomniane przeze mnie podsumowanie mogłoby stanowić niezależne wnioski. Niewątpliwie cenne jest podsumowujące zestawienie w Tabeli 6 zaobserwowanych zmian w poziomie poszczególnych transporterów w PFC i Hp we wszystkich modelach badawczych (niestety bez jej omówienia w dyskusji lub podsumowaniu). Omyłkowo zaznaczono przy tym w niej brak zmian w poziomie poszczególnych transporterów w hipokampie pochodzącym od pacjentów z depresją, a przypadki samobójstw zostały określone po angielsku.

Biorąc pod uwagę fakt, że rozprawa doktorska jest przeważnie pierwszą poważną pracą naukową, nieliczne uwagi lub zagadnienia do dalszej dyskusji w niczym nie umniejszają wartości niniejszej rozprawy doktorskiej. Otrzymane wyniki są nowatorskie, ciekawe, spójne, bardzo dobrze przedstawione i przedyskutowane i uzyskane w oparciu o zastosowanie precyzyjnych, wnikliwie opisanych metod

oraz spełniają warunki określone w artykule 13 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 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455).

Dlatego też z przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Anny Rafała-Ulińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Fiziologii i Patofiziologii
poświadczam

prof. dr hab. Barbara Malinowska