



Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz  
Kierownik Pracowni Molekularnych Podstaw  
Ruchów Komórkowych

Warszawa, 19 marca 2018 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Malwiny Lisek pt.:  
„Ocena zaburzeń neuronalnej homeostazy wapniowej i metabolizmu GABA  
w oparciu o szczurzy model psychoz indukowanych ketaminą”  
wykonanej w Zakładzie Neurochemii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
pod kierunkiem prof. dr hab. Ludmiły Żylińskiej i dr. Tomasza Boczka (promotor pomocniczy)

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Malwiny Lisek dotyczy zrozumienia mechanizmów patogenezы chorób psychiatrycznych, a zwłaszcza psychoz i schizofrenii. Doktorantka podejmuje ważne zagadnienie, gdyż pomimo faktu, że objawy schizofrenii występują bowiem aż u ok. 1% populacji wciąż niewiele wiadomo o patogenezie tej choroby. Jednym z postulowanych mechanizmów są zaburzenia homeostazy wapniowej, której zachowanie jest kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, w tym ośrodkowego układu nerwowego. Zagadnienia związane z udziałem jonów wapnia w neurosekrecji są od lat poruszane w zespole prof. Ludmiły Żylińskiej, która ma na swoim koncie wiele znaczących obserwacji w tej tematyce. Pod opieką prof. Żylińskiej i dr. Tomasza Boczka Doktorantka postanowiła zbadać rolę homeostazy wapniowej oraz szlaków sygnałowych zależnych od jonów w rozwoju stanów psychotycznych. Wykorzystała do tego uznany model psychozy u zwierząt, jakim jest kilkudniowe podawanie szczurom ketaminy w dawkach sub-anestetycznych. Lektura przedstawionej mi do oceny rozprawy pozwala mi na stwierdzenie, że Doktorantka w pełni zrealizowała swoje zamierzenia.

### Formalny opis rozprawy

Doktorantka skorzystała z możliwości, jaką daje Art. 13 pkt. 2 ustawy o stopniach i tytułach naukowych, i przygotowała rozprawę doktorską w formie „(...) *spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych (...)*”. Na rozprawę składają się trzy artykuły doświadczalne i jeden artykuł przeglądowy, które ukazały się w czasopismach z listy filadelfijskiej w latach 2015-2017. Należy podkreślić, że wszystkie publikacje zawarte w rozprawie spełniają ustawowy wymóg spójności tematycznej. W trzech z tych artykułów Doktorantka jest pierwszym autorem, natomiast w jednej - drugim. Należy również podkreślić, że do rozprawy zostały dołączone oświadczenia współautorów, z których jednoznacznie wynika, że mgr Lisek miała wiodący (bądź znaczący) udział w powstanie wszystkich tych publikacji.

Rozprawa zawiera także autoreferat o układzie przypominającym tradycyjne rozprawy doktorskie, a więc są tu: wykaz stosowanych skrótów i symboli, wstęp (z opisem modelu psychoz indukowanych ketaminą), cel pracy, omówienie wyników wchodzących w skład cyklu publikacji przedstawionych jako rozprawa doktorska), wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo odnoszące się do autoreferatu (30 pozycji) oraz wykaz wszystkich publikacji Doktoranta. Na początku autoreferatu znajduje się także lista publikacji składających się na rozprawę wraz z ich danymi naukowymi. Doktorantka zawarła również kopie artykułów składających się na rozprawę.

## Ocena merytoryczna

W sytuacji, gdy na rozprawę składają się opublikowane artykuły recenzent ma moim zdaniem ułatwione zadanie, gdyż zawarte w publikacjach wyniki zostały już poddane wnikliwej ocenie recenzentów, wyznaczonych przez redakcje czasopism. A ci - z reguły anonimowi - nie mają żadnych obiekcji do ostrej krytyki i wskazywania konieczności wykonania dodatkowych doświadczeń.

Rozpocznę od oceny autoreferatu, który został napisany poprawną polszczyzną, acz było sporo sformułowań, które można zaklasyfikować jako kalki z języka angielskiego. Wymienię kilka z nich - poza tradycyjną już uwagą że zamiast zwrotu „coś wiąże się z czymś” Doktorantka konsekwentnie pisała, że "coś wiąże się do czegoś", szczególnie raziły mnie zwroty: „hipofunkcja receptora”, „dysinhibicja neuronów”. Sądzę też, że poprawniej byłoby napisać „stężenie czegoś w cytozolu”, zamiast „stężenie cytozolowe”, „zażywanie leku” zamiast „używanie leku”. Poza tym uważam, że Doktorantka mogłaby pokrótce opisać stosowane w toku pracy metody, a przynajmniej je wymienić. A jest ich przecież niemało - od wyrafinowanych badań na poziomie molekularnym, przez barwienia immunofluorescencyjne skrawków mózgu po badania behawioralne.

We wstępie Doktorantka opisuje zagadnienia poruszane w publikacjach składających się na rozprawę doktorską. Omawia także model psychoz indukowanych ketaminą, uzasadniając wybór modelu w oparciu o antagonizm receptora NMDA, wywołanej przez sub-anestetyczne dawki ketaminy. Zauważyłam tu kilka niefortunnych sformułowań i nieścisłości ; np. co oznacza, że "ketamina jest znanym środkiem rekreacyjnym" (rekreacja kojarzy mi się zgoła z czymś innym), przy rozwijaniu skrótu LSD zabrakło informacji, że jest to pochodna (dietyloamid), a nie kwas lizergowy (choć jest to zawarte w podanej obok nazwie anglojęzycznej); zauważyłam również błąd (literówkę) w nazwie memantyny. Zastanawiam się również, dlaczego Doktorantka nie wspomniała tu o licznych badaniach mających na celu zidentyfikowanie genu (genów) związanych ze schizofrenią. Liczę, że opowie o tym podczas obrony rozprawy.

Cel pracy (jak i cele szczegółowe) został bardzo precyzyjnie określony, a była to wieloaspektowa analiza skutków działania ketaminy na wybrane elementy procesów neurotransmisji. Analiza wyników przedstawionych w publikacjach wykazuje, że Doktorantka zrealizowała je w całości.

W kolejnej części Doktorantka omawia swoje wyniki na tle danych literaturowych. Przyjęty przez nią sposób cytowania literatury powoduje jednak, że momentami dość trudno było mi rozróżnić wyniki innych autorów od tych uzyskanych przez nią samą, zwłaszcza że nie akcentowała tego w tekście. Dotyczy to zwłaszcza artykułu opublikowanego w *Neurochemistry International*, w którym Doktorantka nie jest pierwszym autorem.

Wszystkie wyniki przedstawione w artykułach zostały przejrzyście zaprezentowane, wykonano niezbędne kontrole, a uzyskane dane poddano wnikliwej analizie statystycznej.

W pierwszej publikacji cyklu, która ukazała się w 2016 r. w *Cell Tissue Research* (IF 2,787) Doktorantka zauważa korelację pomiędzy zaburzeniami w sygnalizacji wapniowej w korze i prążkowiu, a zmianami behawioralnymi u szczurów. Wyniki te potwierdzają hipotezę, zaproponowaną niemal cztery dekady temu, o udziale sygnalizacji przez jony wapnia w patogenezie schizofrenii. Doktorantka wykazała również, że zastosowana w badaniach dawka ketaminy powodowała wzrost stężenia jonów wapnia we frakcji cytozolowej kory, hipokampu, prążkowia i mózdzku. Największe zmiany obserwowano w prążkowiu i korze, co korelowało z nadaktywnością motoryczną badanych zwierząt. Doktorantka sugeruje, że przyczyną obserwowanego wzrostu stężenia jonów wapnia może być kompensacyjny napływ tych jonów przez inne receptory glutaminianowe - AMPA i kainowy, a także - co wykazała doświadczalnie - zmiany w ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w homeostazę wapniową. Ciekawi mnie dlaczego te same geny (np. *TRPC1* i *NCX3*) w jednych częściach mózgu są słabiej, a w innych silniej wyrażane. Poza tym, w nawiązaniu do wcześniejszej uwagi, czy wśród analizowanych przez nią genów był(y) gen(y), które zostały wskazane w badaniach wielkoskalowych, jako potencjalnie związane z patogenezą schizofrenii.

W drugiej prac cyklu, opublikowanej w 2017 r. we *Frontiers in Cellular Neuroscience* (IF 4,555) Doktorantka zbadała wpływ ketaminy na aktywność plazmatycznej pompy wapniowej (PMCA) w różnych częściach mózgu oraz oddziaływania tego białka z receptorem NMDA, w którym pośredniczy białko gęstości postsynaptycznych (PSD95), a także na uwalnianie glutaminianu z zakończeń nerwowych. Należy zaznaczyć, że Doktorantka w poprzednim artykule wykazała, że po podawaniu ketaminy ekspresja genów kodujących izoformy PMCA (PMCA1-4) zmienia się w badanych częściach mózgu. Podawanie leku spowodowało zahamowanie aktywności PMCA w mózdzku, hipokampie i prążkowie, czemu towarzyszył spadek poziomu białka i zmiana składu jego izoform. Zaobserwowała również, że poziom PSD95 i jego oddziaływanie z PMCA4 w wielu częściach mózgu były zwiększone po podaniu ketaminy; widoczne było również bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy PSD95 i receptorem NMDA. Jej zdaniem wskazuje to na tworzenie wieloskładnikowych kompleksów białkowych, które mogą uczestniczyć w obserwowanym wpływie ketaminy na sygnałowanie przez jony wapnia. Wykazała też, że ketamina w podawanych dawkach nie powodowała zmian w stężeniu glutaminianu (i glutaminy), natomiast powodowała zwiększenie sekrecji glutaminianu z synaptosomów, otrzymanych z kory i prążkowie badanych zwierząt. Zaobserwowała również zmiany poziomu białek zaangażowanych w transport glutaminianu (wzrastał VGLUT1 w korze i VGLUT2 w prążkowie, a spadał EAAT2 w korze) Kontynuowała również badania behawioralne szczurów poddawanych działaniu ketaminy i potwierdziła psychotyczne zachowania wywołane podawaniem tego leku. Swoje obserwacje podsumowała w schemacie (Figure 9 w artykule), który jest moim zdaniem mało czytelny. Uzyskane przez nią wyniki wskazują zatem na istotną rolę PMCA w rozwoju psychozy wywołanej podawaniem ketaminy.

W ostatniej pracy doświadczalnej, opublikowanej w 2015 r. w *Neurochemistry International* (IF 3,385) Doktorantka uczestniczyła w badaniach nad wpływem ketaminy na metabolizm kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA). Wykazała zmiany w poziomie i aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm GABA - dekarboksylaz glutaminianowych, GAD65 i GAD67, transaminazy GABA (GABA-T) oraz dehydrogenazy semialdehydu bursztynowego (SSADH). Poziom GAD67 spadał w korze, mózdzku i hipokampie, natomiast poziom GAD65 wzrastał w hipokampie, a spadał w prążkowie. Odpowiada to aktywności GAD - tam, gdzie spadał poziom białka - niższa była aktywność, a tam gdzie wzrastał - aktywność była wyższa. Obserwowała również spadek w aktywności (oraz poziomie białka) GABA-T w korze i mózgowiu oraz SSADH w korze, mózdzku i prążkowie, przy czym nie wykryto zmian w poziomie białka. Powyższym zmianom towarzyszył spadek w stężeniu GABA w badanych regionach mózgu, a w prążkowie także spadek w uwalnianiu tego neurotransmitera. Doktorantka próbując zrozumieć mechanizm obserwowanych zmian podkreśla złożoność mechanizmu działania ketaminy na system GABA-ergiczny oraz zróżnicowanie efektów wywołanych przez ketaminę w różnych częściach mózgu.

Czwarty artykuł, przeglądowy, ukazał się on-line w 2017 r. w *Neuroscience Letters* (IF 2,180). Jest to podsumowanie wiedzy o zaburzeniach w sygnałowaniu przez jony wapnia w chorób psychiatrycznych, a w szczególności o udziale PMCA i oddziałujących z nią białek w patogenezie choroby dwubiegunowej i schizofrenii. Jeden z podrozdziałów omawia także użyty przez Doktorantkę model psychozy wywołanej przez podawanie ketaminy; cytowane są tu prace zespołu prof. Żylińskiej, w tym te wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr Lisek. Świadczy to o istotnym wkładzie badań grupy promotor rozprawy w zrozumieniu mechanizmu zaburzeń w homeostazie wapniowej i aktywności synaptycznej, które występują w schizofrenii.

Przedstawienie rozprawy w postaci publikacji skutkuje brakiem tradycyjnej dyskusji. Osobiście najbardziej lubię ten fragment rozpraw doktorskich, bo tu widać dojrzałość (lub jej brak) doktorantów. W tym przypadku zamiast jednej dyskusji są ich aż trzy, a stanowiący część rozprawy artykuł przeglądowy (opublikowany w *Neuroscience Letters*, IF 2,180) to w zasadzie superdyskusja wyników uzyskanych przez Doktorantkę (i zespół prof. Żylińskiej) w odniesieniu do PMCA, jednego z kluczowych białek homeostazy wapniowej w mózgu. Elementy dyskusji są także w autoreferacie. Lektura wszystkich tych składowych wskazuje na dojrzałość naukową Doktorantki i

doskonałą znajomość tematyki, którą się zajmuje. Doktorantka umiejętnie omawia swoje wyniki, posiłkując się dostępną bibliografią, wskazuje na złożoność badanych zagadnień i jest świadoma, że jej badania, choć bardzo obiecujące, nie dają jednoznacznej i finalnej odpowiedzi na pytanie o patomechanizm psychoz.

### **Podsumowanie**

Rozprawa doktorska Pani mgr Malwiny Lisek ma bardzo dużą wartość poznawczą i znacznie wzbogaca naszą wiedzę o sygnałowaniu przez jony wapnia w układzie nerwowym, a zwłaszcza roli zaburzeń w homeostazie wapniowej w patogenezie chorób psychiatrycznych. Wyjątkowo obszerny materiał doświadczalny, bogaty warsztat metodyczny oraz bardzo dobrze udokumentowane i opublikowane oryginalne wyniki badań świadczą o doskonałym przygotowaniu Autorki do samodzielnej pracy naukowej. Doktorantka wykazała się umiejętnością zdefiniowania ważkiego problemu badawczego, który wskazując również kierunek przyszłych badań, w tym potencjalnie aplikacyjnych. Wykazała się także znajomością rozległego piśmiennictwa w dziedzinie swoich zainteresowań oraz zdolnością do krytycznej analizy własnych wyników badań w oparciu o dane literaturowe. W mojej ocenie uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią zaczątek do dalszych badań, zaś wyciągnięte przez Doktorantkę wnioski są w pełni uzasadnione.

Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka jest również współautorem sześciu innych artykułów opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz artykułu przeglądowego opublikowanego w *Postęпах Biochemii*. Wszystkie one dotyczą obszaru zainteresowań Doktorantki, wskazując, że jej wiedza i umiejętności są przydatne nie tylko innym badaczom w zespole. Wyniki Doktorantki były prezentowane na kilku międzynarodowych konferencjach, ale z zamieszczonej listy nie wynika, czy przez nią samą.

W mojej ocenie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr Malwiny Lisek do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez nią stopnia doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej.

Ponadto, zważywszy na wysoką wartość poznawczą recenzowanej rozprawy doktorskiej z całym przekonaniem wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną dla szacownej Rady nagrodą.

Maria Jolanta Rędownicz

