



Dr hab. n. med. Izabela Zawlik, prof. UR
Zakład Genetyki Ogólnej i Klinicznej
Instytut Nauk Medycznych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 22.04.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Rafała Świechowskiego pt.:
„Polimorfizmy i ekspresja wybranych cytochromów u pacjentów z depresją”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana magistra Rafała Świechowskiego pt.: „Polimorfizmy i ekspresja wybranych cytochromów u pacjentów z depresją” została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. farm. Ewy Balcerczak oraz Pani dr n. farm. Agnieszki Jeleń pełniącej rolę promotora pomocniczego. Praca doktorska została przygotowana w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Praca doktorska dotyczy oceny potencjalnego znaczenia klinicznego wariantów allelicznych *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* oraz *CYP2C19*2* w depresji nawracającej. Dodatkowo u części chorych z depresją dokonano oceny ekspresji genu *CYP3A4* oraz powiązania go z wariantem polimorficznym *CYP3A4*1B* i parametrami klinicznymi. Temat podjęty w pracy doktorskiej jest istotny dla określenia klinicznego znaczenia polimorfizmów genetycznych wybranych cytochromów w zaburzeniach depresyjnych nawracających.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu liczącego 114 stron. Praca ma typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na rozdziały: wstęp, założenia i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie (w języku polskim i angielskim), spis rycin i tabel oraz piśmiennictwo. Praca zawiera wykaz skrótów, 32 wykresy oraz 19 tabel.

Piśmiennictwo obejmuje 131 pozycji literaturowych pochodzących głównie z ostatnich kilku lat z dominacją literatury anglojęzycznej. Dodatkowo do pracy dołączono wykaz publikacji i doniesień zjazdowych Doktoranta. Dorobek publikacyjny Doktoranta stanowią 4 prace opublikowane w latach 2015-2019 (w tym jedna publikacja obejmuje wstępne badania zawarte w pracy doktorskiej) i 9 komunikatów zjazdowych zaprezentowanych w latach 2013-2017. Sumaryczny współczynnik oddziaływania dorobku publikacyjnego Doktoranta wynosi 6,682 i należy go uznać za wysoki biorąc pod uwagę wczesny etap kariery naukowej Doktoranta.

Cała rozprawa doktorska napisana jest w zwartym i syntetycznym stylu. Pierwszy i drugi rozdział pracy stanowi dokładną analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość prowadzonych badań. W pierwszym rozdziale pracy przedstawiono szczegółowy opis dotyczący epidemiologii, etiopatogenezy oraz diagnostyki i leczenia zaburzeń depresyjnych. W drugim rozdziale przedstawiono dokładną charakterystykę analizowanych cytochromów. Założenia pracy zostały jasno sformułowane. W pracy założono, że polimorfizmy wybranych cytochromów mogą mieć znaczenie w etiopatogenezie oraz w procesie leczenia zaburzeń depresyjnych. Bardzo istotne dla praktycznego zastosowania uzyskanych wyników jest to, że w pracy uwzględniono cytochromy, które odgrywają kluczową rolę w metabolizmie obecnie stosowanych leków przeciwdepresyjnych.

Cele pracy zostały precyzyjnie przedstawione w czterech punktach i poprawność ich sformułowania nie budzi wątpliwości. Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane w kontekście spełnienia założonych celów pracy doktorskiej. Grupę badaną stanowiło 108 pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi nawracającymi (72 kobiety i 36 mężczyzn), którzy zostali zakwalifikowani w oparciu o kryteria ICD-10. Mediana wieku w grupie chorych wynosiła 51 lat. Grupę kontrolną zdrową stanowiło 93 osób (57 kobiet i 36 mężczyzn) z medianą wieku 40 lat. Zastrzeżenie w tym miejscu budzi zbyt ogólna charakterystyka pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi oraz osób stanowiących grupę kontrolną zdrową. W pracy nie podano przykładowo informacji dotyczących chorób współistniejących pacjentów czy przyjmowania innych leków. W pracy nie wyjaśniono również na podstawie jakich kryteriów dokonano doboru grupy kontrolnej.

Z drobnych błędów edytorskich należy wymienić powtórzenie 5 zdań dotyczących opisu grupy badanej i kontrolnej na str. 43. Jednakże wskazane powyżej uwagi i błędy edytorskie nie zmniejszają wysokiego poziomu merytorycznego przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. Zastosowane w pracy metody molekularne zostały bardzo szczegółowo opisane. Skład mieszaniny reakcyjnej dla poszczególnych metod oraz warunki prowadzenia reakcji zostały dokładnie przedstawione. Obecność alleli *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* oraz *CYP2C19*2* oceniono przy użyciu metody PCR-RFLP. W opisie tej metody wymieniono zastosowane enzymy restrykcyjne, podano sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne oraz podano długości fragmentów restrykcyjnych, co ułatwia interpretację wyników. Analizę ekspresji genu *CYP3A4* określono u 38 pacjentów z wykorzystaniem metody Real-Time PCR. Ze względu na różnicę w wydajnościach reakcji dla genu metabolizmu podstawowego- *GAPDH* i genu badanego- *CYP3A4* do obliczenia relatywnego poziomu ekspresji genu badanego wybrano model matematyczny według Pfaffla. Zastrzeżenie w tym miejscu budzi zbyt ogólny opis modelu matematycznego według Pfaffla; zarówno w rozdziale 2.2.7, jak i 3.2 nie podano wystarczającego opisu. W pracy doktorskiej zastosowano adekwatne dla rozwiązania problemów badawczych analizy statystyczne.

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w uporządkowany sposób, a właściwie dobrane tabele i wykresy ułatwiają analizę wyników. Do najważniejszych uzyskanych wyników należy wykazanie statystycznie istotnej różnicy w częstości występowania poszczególnych genotypów oraz dystrybucji allelu *CYP3A5*3* pomiędzy grupą badaną a kontrolną. W pracy doktorskiej wykazano, że allel *CYP3A5*3* występował rzadziej w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy badanej. Natomiast nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic w częstości występowania allelu *CYP3A4*1B* oraz *CYP2C19*2* pomiędzy grupą badaną i kontrolną. Dla polimorfizmu *CYP3A5*3* wykazano również statystycznie istotną zależność pomiędzy poszczególnym genotypem i dystrybucją allelu dzikiego a wiekiem w momencie diagnozy. Pacjenci z genotypem *CYP3A5*3/*3* byli diagnozowani w młodszym wieku w porównaniu do pacjentów z genotypem *CYP3A5*1/*3*. Wykazano również zależność pomiędzy obecnością allelu *CYP2C19*2* a skutecznością leczenia wyrażoną jako % zmiany HDRS. Pacjenci z przynajmniej jednym allelem *CYP2C19*2*

mieli lepsze rezultaty leczenia. Potwierdzono również statystycznie istotny związek pomiędzy rozkładem poszczególnych genotypów polimorfizmu *CYP2C19*2* a płcią. Względny poziom ekspresji genu *CYP3A4* nie różnił się istotnie w zależności od płci i wieku pacjenta. Nie wykazano wpływu polimorfizmu *CYP3A4*1B* na względny poziom ekspresji genu *CYP3A4*.

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 Doktoranta w aktualnej literaturze dotyczącej związku badanych polimorfizmów z rozwojem depresji i ich klinicznym znaczeniem. Na podstawie uzyskanych wyników prawidłowo sformułowano wnioski końcowe wskazujące na możliwą protekcyjną rolę genotypu *CYP3A5*3/*3* w rozwoju zaburzeń depresyjnych. Genotyp *CYP3A5*3/*3* może także odpowiadać za wystąpienie pierwszych objawów choroby w młodszym wieku. Uzyskane wyniki wskazują również na potencjalny wpływ występowania allelu *CYP2C19*2* na lepszą odpowiedź na leczenie. Natomiast zmiany ekspresji względnego poziomu genu *CYP3A4* nie mają istotnego wpływu na rozwój, przebieg i skuteczności leczenia depresji. Przedstawione w pracy doktorskiej wnioski końcowe nie budzą żadnych zastrzeżeń.

Podsumowując, prezentowana praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autora oraz opanowanie przez niego warsztatu badawczego. Wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej, a uwagi przedstawione w recenzji nie umniejszają mojej wysokiej oceny tej pracy. Praca doktorska pt.: „Polimorfizmy i ekspresja wybranych cytochromów u pacjentów z depresją” w pełni spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego wnoszę o dopuszczenie Pana magistra Rafała Świechowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą prowadzonych badań, pragnę złożyć wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.



Dr hab. n. med. Izabela Zawlik, prof. UR