

pat. 248/15.06.2020

Prof. dr hab. Jerzy Samochowiec

Szczecin 2020-06-08

Katedra i Klinika Psychiatrii PUM w Szczecinie

Broniewskiego 26

71 - 460 Szczecin

Ocena rozprawy doktorskiej

lek. Katarzyny Bliźniewskiej-Kowalskiej

„Znaczenie ekspresji wybranych genów modulujących proces neurogenezy w etiologii zaburzeń depresyjnych”

Depresja należy do najczęstszych zaburzeń psychicznych. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (*WHO - World Health Organization*) ponad 264 miliony osób na świecie cierpi z powodu depresji. Badania genetyczne depresji sugerują, że dziedziczenie depresji nie jest zgodne z klasycznym wzorcem mendlowskim, co oznacza, że przekazanie jednego wadliwego genu nie tłumaczy całego zwiększonego ryzyka rozwoju zaburzeń depresyjnych. Powstało wiele teorii dotyczących etiopatogenezy tych zaburzeń afektywnych.

Neurogeneza, czyli proces tworzenia nowych komórek nerwowych, występuje także u osób dorosłych [*AN - Adult Neurogenesis*]. W dorosłym mózgu proliferacja komórek macierzystych w kierunku neuronów zachodzi przede wszystkim w dwóch specyficznych obszarach: w strefie podziarnistej (*SGZ - subgranular zone*) zakrętu zębatego (*DG - dentate gyrus*) formacji hipokampa oraz w strefach podkomorowych (*SVZ - subventricular zone*) przylegających do komór bocznych mózgu. Bezpośrednie zbadanie poziomu neurogenezy w żywym mózgu dorosłego człowieka jest trudne. Pierwsze dowody na istnienie ludzkiej neurogenezy u dorosłych oparto na eksperymentach z bromodeoksyurydyną (*BrdU*). Metoda polega na znakowaniu dzielących się komórek i śledzeniu ich komórek potomnych przy pomocy immunofluorescencji. W ten sposób zaobserwowano proces neurogenezy w obrębie hipokampa u pacjentów *post mortem*. W późniejszym okresie poziom neurogenezy dorosłych był oceniany przy użyciu datowania węglem radiowęglowym (*C14*), jednak było to bardzo trudne metodologicznie. Neurogeneza może być także badana na modelach komórkowych *in vitro*. Komórki macierzyste lub neuroblasty są izolowane z ludzkich hipokampów *post mortem*,

by móc ocenić ich zdolność do tworzenia neuronów. Są stosowane także inne metody immunocytochemiczne.

Dysertacja zawarta jest na 111 stronach. Po wstępie następują kolejno dwa rozdziały: część teoretyczna, w której Autorka opisała znaczenie procesu neurogenezy w patogenezie zaburzeń depresyjnych, charakterystykę wybranych czynników modulujących proces neurogenezy, wpływ mechanizmów epigenetycznych na neurogenezę oraz znaczenie teneuryn w procesie neurogenezy oraz część empiryczna, w którym przedstawiła cel i założenia pracy, materiał i metody, wyniki badań, dyskusja, limitacje, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz załączników. Piśmiennictwo zawiera 182 polskich i zagranicznych pozycji, zostało dobrane prawidłowo, ze znajomością prezentowanego zagadnienia.

Głównym celem badawczym była ocena znaczenia wybranych genów modulujących proces neurogenezy w etiopatogenezie zaburzeń depresyjnych.

Szczegółowe cele pracy:

- 1) Ocena w grupie chorych z zaburzeniami depresyjnymi (grupa eksperymentalna) oraz grupie osób zdrowych (grupa porównawcza) ekspresji na poziomie mRNA i na poziomie białka wybranych genów modulujących proces neurogenezy:
 - gen NGF (Nerve Growth Factor),
 - gen BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor),
 - gen GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor),
 - gen REST (RE1- Silencing Transcription factor / Neuron-Restrictive Silencer Factor),
 - gen MicroRNA 137-mir (MIR137) (jedynie na poziomie mRNA),
 - gen ODZ4 (TENM4 - teneurin transmembrane protein 4) (jedynie na poziomie mRNA).
- 2) Określenie zależności pomiędzy ekspresją na poziomie mRNA i białka wybranych genów, a danymi klinicznymi, w tym nasileniem objawów choroby mierzonych skalą depresji Hamiltona, w grupie chorych z zaburzeniami depresyjnymi (grupa eksperymentalna).
- 3) Ocena związku pomiędzy ekspresją na poziomie mRNA i białka wybranych genów a zmiennymi socjodemograficznymi w grupie eksperymentalnej i porównawczej.

Doktorantka postawiła następujące hipotezy badawcze:

1. Ekspresja na poziomie mRNA i białka genów kodujących czynniki neurotroficzne (NGF, BDNF i GDNF) u pacjentów cierpiących na zaburzenia depresyjne jest istotnie obniżona w porównaniu z grupą porównawczą.
2. Ekspresja na poziomie mRNA i białka genu REST u pacjentów cierpiących na zaburzenia depresyjne jest istotnie wyższa niż w grupie porównawczej.
3. Ekspresja na poziomie mRNA genu MIR-137 u pacjentów cierpiących na zaburzenia depresyjne jest istotnie obniżona w porównaniu z grupą porównawczą.
4. Ekspresja na poziomie mRNA genu ODZ4/TENM4 u pacjentów cierpiących na zaburzenia depresyjne jest istotnie obniżona w porównaniu z grupą porównawczą.
5. Poziom ekspresji genów modelujących proces neurogenezy koreluje z nasileniem objawów depresyjnych.
6. Poziom ekspresji genów modulujących proces neurogenezy jest powiązany z przebiegiem choroby (pierwszy epizod choroby (F32) a zaburzenia depresyjne nawracające (F33)).
7. Poziom ekspresji genów modulujących proces neurogenezy nie jest powiązany z ocenianymi zmiennymi socjodemograficznymi.

Badanie zostało przeprowadzone w Klinice Psychiatrii Dorosłych Katedry Chorób Układu Nerwowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Do badania zakwalifikowano łącznie 189 osób w tym 133 kobiety i 56 mężczyzn w wieku od 18 do 65 lat.

Kryteria wykluczające z udziału w badaniu sformułowano następująco:

- wiek poniżej 18 lat,
- rozpoznania psychiatryczne inne niż zaburzenia depresyjne,
- choroba nowotworowa w wywiadzie,
- poważne choroby neurologiczne, uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, które mogłyby mieć wpływ na ekspresję badanych genów,
- inne poważne schorzenia somatyczne mogące mieć wpływ na ekspresję badanych genów,
- nadużywanie i uzależnienie od substancji psychoaktywnych (SPA).

Grupę eksperymentalną stanowiło 95 pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi, w tym 67 kobiet i 28 mężczyzn w wieku od 18 do 65 lat. Grupę porównawczą stanowiło 94 zdrowych ochotników w tym 66 kobiet i 28 mężczyzn w wieku od 22 do 63 lat.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Po uzyskaniu świadomej zgody pacjenta na udział w badaniu od wszystkich uczestników uzyskano dane socjodemograficzne takie jak: wiek, płeć, poziom wykształcenia.

U pacjentów z grupy eksperymentalnej rozpoznanie epizodu depresyjnego (F32) lub zaburzeń depresyjnych nawracających (F33) postawiono na podstawie kryteriów diagnostycznych Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych ICD-10. Ponadto, oceniano stopień nasilenia objawów depresyjnych przy użyciu Skali Depresji Hamiltona (HDRS – Hamilton Depression Rating Scale).

Następnie od osób uczestniczących w badaniu (grupa eksperymentalna i grupa porównawcza) jednorazowo pobrano krew żylną w ilości 10 ml.

Doktorantka sformułowała następujące wnioski płynące z wyników jej badań:

1. Ekspresja na poziomie mRNA i na poziomie białka wybranych genów modulujących proces neurogenezy może mieć znaczenie w etiopatogenezie zaburzeń depresyjnych.
 - a. Ekspresja genu NGF zarówno na poziomie białka jak i na poziomie mRNA jest niższa u pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi niż w grupie porównawczej osób zdrowych.
 - b. Ekspresja genu BDNF zarówno na poziomie białka jak i na poziomie mRNA jest niższa u pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi niż w grupie porównawczej osób zdrowych.
 - c. Ekspresja klasycznych neurotrofin jest obniżona u pacjentów z depresją.
 - d. Ekspresja genu GDNF zarówno na poziomie białka jak i na poziomie mRNA jest wyższa u pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi niż w grupie porównawczej osób zdrowych.
 - e. Ekspresja genu REST zarówno na poziomie białka jak i na poziomie mRNA jest niższa u pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi niż w grupie porównawczej osób zdrowych.
 - f. Ekspresja genu miR-137 na poziomie mRNA jest wyższa u pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi niż w grupie porównawczej osób zdrowych.
 - g. Ekspresja genu ODZ-4 na poziomie mRNA jest niższa u pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi niż w grupie porównawczej osób zdrowych.

2. Ekspresja analizowanych genów modulujących proces neurogenezy nie zależy od nasilenia objawów depresyjnych, płci ani wieku badanych osób.
3. Ekspresja większości analizowanych genów, z wyjątkiem ODZ4, nie zależy od tego czy był to pierwszy epizod depresji czy zaburzenia depresyjne nawracające. U pacjentów z pierwszym epizodem depresji stwierdza się wyższą średnią ekspresję ODZ4 na poziomie mRNA niż u pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi nawracającymi.
4. Ekspresja większości analizowanych genów, z wyjątkiem NGF, nie jest powiązana z poziomem wykształcenia pacjentów z depresją. W przypadku genu NGF stwierdzono, że im wyższe wykształcenie tym wyższa ekspresja tego genu.

Do pracy nie mam uwag merytorycznych: napisana jest poprawną polszczyzną, tekst sformułowany jest jasno. Praca spełnia kryteria rozprawy doktorskiej, stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego przez Doktorantkę.

Opiniowana w rozdziale 4 sama trafnie i z dużą pokorą naukową określiła ograniczenia swojej pracy: „Do badania zakwalifikowani byli pacjenci z rozpoznaniem epizodu depresyjnego (F32) lub zaburzeń depresyjnych nawracających (F31). Mimo dokładnego wywiadu nie można wykluczyć, iż część pacjentów biorących udział w badaniu w przyszłości nie rozwinie epizodu hipomaniakalnego lub maniakalnego i w związku z powyższym pierwotne rozpoznanie nie zostanie zmienione na zaburzenia afektywne dwubiegunowe (F31) [Gorostowicz i Siwek, 2018].

Badania wskazują, że oznaczenia z krwi obwodowej ekspresji na poziomie mRNA h i na poziomie białka dla genów w znacznym stopniu odzwierciedlają ekspresję w ośrodkowym układzie nerwowym [Sullivan et al., 2006], jednak brak możliwości porównania w dostępnej literaturze wyników dla wybranych genów w grupie pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi.

Badani pacjenci z depresją byli starsi i mniej wykształceni niż osoby z grupy kontrolnej. Jednak w badaniu nie wykazano zależności między wiekiem a ekspresją badanych genów u pacjentów z grupy badanej. W grupie kontrolnej także w znacznej większości przypadków nie zaobserwowano takiej zależności. Ekspresja była zależna od poziomu wykształcenia tylko w przypadku jednego z badanych genów.”



Doktorantka w swojej aktywności naukowej była kilkakrotnie współautorem artykułów, także w czasopismach z listy filadelfijskiej.

Zatem w końcowej ocenie stwierdzam, iż praca doktorska lek. Katarzyny Bliźniewskiej-Kowalskiej „Znaczenie ekspresji wybranych genów modulujących proces neurogenezy w etiologii zaburzeń depresyjnych” w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych (Dz.U. nr 65/2003). Wniosuję o dopuszczenie lek. Katarzyny Bliźniewskiej-Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i o wyróżnienie pracy.

6567572 prof. dr hab. Jerzy Samochowiec
specjalista psychiatra
certyfikowany psychoterapeuta PTP
nr 475

