

Poznań 15.03.2022

Prof. dr hab. Filip Rybakowski,

Klinika Psychiatrii Dorosłych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Recenzja pracy doktorskiej lek. Marty Broniarczyk-Czarniak „Ocena ekspresji genów OXT, OXTR, AVP, AVPR1a u pacjentów ze schizofrenią”.

Wstęp

Próby wyjaśnienia procesów etiopatogenetycznych leżących u podstaw schizofrenii nie przyniosły do tej pory pełnego sukcesu. Pomimo, że ta poważna choroba psychiczna postrzegana jest głównie poprzez objawy psychotyczne, takie jak urojenia i omamy, to większą rolę w funkcjonowaniu pacjenta i długoterminowym rokowaniu odgrywają objawy negatywne, określane również jako ubytkowe. Do najważniejszych z nich zalicza się zaburzenia interakcji społecznych, takie jak wycofanie i niechęć do kontaktów, zaabsorbowanie własnymi przeżyciami i trudności w komunikowaniu się.

Wskazuje się, że za nasze zdolności do interakcji z innymi osobami odpowiadają specyficzne umiejętności określane wspólnie mianem poznania społecznego. W obrębie tego szerokiego konstruktu psychologicznego umieszcza się zarówno względnie proste funkcje, jak rozpoznawanie twarzy, czy zdolność do rozróżniania emocji na podstawie ekspresji mimicznej, ale także bardziej złożone umiejętności jak trafność przewidywania myśli i zamiarów innych osób. Badania neuroobrazowe wskazują, że w poznaniu społecznym uczestniczą określone obszary mózgu, np. zakręt wrzecionowaty odpowiada za identyfikację znanych osób. Nadal jednak wiemy bardzo niewiele na temat struktur OUN oraz procesów neurobiologicznych stanowiących podłoże pozostałych umiejętności społecznych. Jednym z wyjątków jest dobrze potwierdzona rola peptydów produkowanych w jądrach podwzgórza – oksytocyny i wazopresyny. Są one uwalniane do krwioobiegu, oddziałując endokrynowo na narządy docelowe. Od niedawna wiadomo również, że neurony produkujące OXY i AVP, uwalniają je jako neuroprzekaźniki ze swoich aksonów zlokalizowanych w wielu strukturach OUN, gdzie peptydy wpływają na różnorodne zachowania społeczne.

Prowadzone od lat 90-ych XX wieku intensywne badania nad wpływem tych substancji na fizjologiczne zachowania zwierząt są fascynujące nie tylko dla profesjonalistów, ale także dla osób tylko okazjonalnie zainteresowanych nauką. Dzieje się tak, ponieważ badania nad modelami zwierzęcymi próbuje się odnosić do ludzkich zachowań społecznych. Te z kolei mogą być analizowane na wielu poziomach, począwszy od neurobiologicznego na moralnym skończywszy. Odkrycie, że monogamiczny nornik preriowy różni się od poligamicznego nornika górskiego wyłącznie liczbą mózgowych receptorów dla oksytocyny i wazopresyny może skłaniać do zastanowienia. Co więcej, poprzez manipulację liczbą tych receptorów można przemieniać osobniki wierne w rozwiązłe i vice versa. Nie dziwi zatem, że dane te mogą prowadzić niekiedy do redukcjonistycznych interpretacji ludzkich zachowań i związanych z nimi burzliwych dyskusji.

Wpływ oksytocyny na poprawę zdolności społecznych w modelach zwierzęcych stał się przyczynkiem do rozpoczęcia prób klinicznych z oksytocyną u ludzi. Badania prowadzono w wielu zaburzeniach, w których deficyty interakcji są podstawowym objawem, m.in. w zespole lęku społecznego, zaburzeniach ze spektrum autyzmu, a także w schizofrenii. W żadnym przypadku nie dowiedziono znaczącej poprawy, jednak wskazuje się, że próby dopiero się rozpoczynają, a brak korzystnych wyników może wynikać z trudności metodologicznych, np. ze stosowania peptydu w heterogennych grupach pacjentów, u których deficyty społecznego mogą być uwarunkowane różnorodnymi mechanizmami patogenetycznymi.

Ze wszystkich powyższych powodów tematykę pracy doktorskiej Marty Broniarczyk-Czarniak „Ocena ekspresji genów OXT, OXTR, AVP, AVPR1a u pacjentów ze schizofrenią” uznaję za ciekawą, trafnie dobraną i mającą potencjalnie istotne znaczenie kliniczne. Jej wyniki mogą pomóc w odnalezieniu biomarkerów choroby, poprawić rozumienie jej patogenezы, a także wskazać obszary, na które należy ukierunkować oddziaływania terapeutyczne.

Informacje ogólne i streszczenie pracy doktorskiej

Rozprawa doktorska lek. Marty Broniarczyk- Czarniak liczy 118 stron, składa się z 9 rozdziałów o względnie typowym układzie pracy naukowej. Pierwsze dwie części stanowią streszczenia, odpowiednio w języku polskim i angielskim, po których następują części, określone przez autorkę mianem teoretycznej i empirycznej. Części V- IX stanowią kolejno spis tabel, spis rycin, spis skrótów, wykaz załączników oraz piśmiennictwo. Należy zauważyć, że część teoretyczna pracy odpowiada wstępowi, natomiast materiał i metody, wyniki oraz dyskusję autorka umieściła w części empirycznej. Rozumiem intencję doktorantki, aby oddzielić to co już wiadomo, czyli teorię, od tego co jest przedmiotem dysertacji – pracy doświadczalnej, jednak dyskusja i wnioski są nawiązaniem do istniejącej wcześniej wiedzy i próbą pogodzenia z nią własnych wyników, a zatem stanowią ponownie rozważania teoretyczne.

Rozdział III jest zbiorem najważniejszych informacji nt. schizofrenii - epidemiologii, rozpoznawania, wybranych czynników etiopatogenetycznych oraz ryzyka samobójstwa. Ponadto znalazły się w nim informacje nt. genów oksytocyny (OXY), receptora oksytocyny (OXR), a także wazopresyny argininowej (AVP) oraz jej receptora typu 1a (AVPR1a). W 1 części Rozdziału IV wyszczególniono założenia i cel pracy. Znalazło się tutaj zdanie, że celem pracy jest „ocena znaczenia genów... w etiopatogenezie schizofrenii”. Nie jest to sformułowanie trafne, ponieważ celem pracy jest ocena ekspresji genów na poziomie mRNA, jak i białka. Gdy mówimy o znaczeniu genów mamy na myśli sekwencję DNA – wzorzec, który przekazywany jest kolejnemu pokoleniu. Gen może posiadać swoje warianty – allele, jeśli dany wariant wiąże się z większym ryzykiem danej choroby, niż inny wariant, wówczas możemy mówić o znaczeniu genów w jej etiopatogenezie. W swojej pracy autorka nie badała wariantów genetycznych żadnego ze wspomnianych w tytule genów, a jedynie ich ekspresję. W kolejnych zdaniach doktorantka wymienia szczegółowe cele pracy, które formułuje w sposób poprawny. W części 3. Materiał i metody opisano grupy badane – 2 grupy kliniczne (do 2 lat od zachorowania, 10-15 lat od zachorowania) oraz grupę kontrolną. Należy zauważyć, że grupy wydają się odpowiednio liczne dla przeprowadzenia badania, choć nie wykonano analizy mocy dla prowadzonych porównań. Kolejno następuje opis procedury badania oraz zastosowanych skal psychometrycznych oraz ankiety własnego autorstwa. W następnych podrozdziałach doktorantka przedstawia metody laboratoryjne służące ocenie ekspresji mRNA oraz białek, a także użyte testy statystyczne – nie mam żadnych zastrzeżeń

do tej części rozprawy. W części 3 Rozdziału IV przedstawiono wyniki badań. Kolejno przedstawiono porównanie wieku i proporcji płci badanych – grupy były względnie dobrze zbilansowane pod względem płci oraz dobrze dobrane pod względem wieku. Wyniki analizy skali PANSS wskazują, że w obu grupach pacjentów występowało duże nasilenie objawów, natomiast objawy depresyjne nie były nasilone. W analizach dotyczących genu OXT wykazano, że zarówno na poziomie mRNA jak i białka pacjenci ze schizofrenią z długim czasem trwania choroby cechowali się najmniejszym, a osoby z grupy kontrolnej największym poziomem ekspresji, przy czym wszystkie różnice były istotne statystycznie. W przypadku genu OXTR wykazano, że zarówno na poziomie mRNA jak i białka pacjenci ze schizofrenią z długim czasem trwania choroby cechowali się największym, a osoby z grupy kontrolnej najmniejszym poziomem ekspresji, przy czym wszystkie różnice były istotne statystycznie. Dla genu AVP statystyczne różnice w ekspresji zarówno mRNA, jak i białka dotyczyły porównań pomiędzy oboma grupami klinicznymi, a grupą kontrolną; grupy kliniczne nie różniły się od siebie. W przypadku genu receptora AVP 1a różnica istotna statystycznie, zarówno dla białka, jak i mRNA dotyczyła porównania pomiędzy grupą chorującą >10 lat, a grupą chorującą od niedawna oraz grupą kontrolną. A zatem nie zaobserwowano żadnych różnic pomiędzy analizami prowadzonym dla mRNA i dla białek. W analizie korelacji pomiędzy wynikami w skalach psychometrycznych, a poziomem ekspresji wykazano istotną korelację pomiędzy nasileniem depresji mierzonym CDSS a ekspresją OXT na poziomie mRNA i białka. W dalszej części podrozdziału autorka przedstawia korelację pomiędzy występowaniem prób samobójczych, a nasileniem objawów mierzonym za pomocą skal i podskal stosowanych w badaniu; a także pomiędzy występowaniem prób samobójczych, a ekspresją poszczególnych białek i ich receptorów. Moje uwagi do tej części: dlaczego doktorantka przedstawia osobno analizy dla mRNA i białka, jeśli w każdym przypadku wyniki są jednakowe (jakie jest uzasadnienie biologiczne dla takiego postępowania)? Czy istnieje korelacja (odwrotna) pomiędzy ekspresją hormonu, a ekspresją jego receptora – może warto ją przedstawić? Mała uwaga redakcyjna – poziom istotności statystycznej nie musi być podawany z dokładnością do 5 miejsc po przecinku, jeśli doktorantka za poziom istotności przyjęła  $p < 0.05$ . W przypadku korelacji ze skalami i z próbami samobójczymi – nie założono wstępnych hipotez, co powoduje, że do wyników należy podchodzić z dużą ostrożnością. Przy wykonywaniu tak dużej liczby porównań – wynik istotny statystycznie jest prawdopodobnie fałszywie dodatni.

Część 4 Rozdziału IV – Dyskusja stanowi próbę umiejscowienia uzyskanych danych w kontekście istniejącej już wiedzy. Doktorantka czyni to umiejętnie, jednak wydaje się, że niekiedy wyraża sądy nazbyt odważne. Na przykład, podaje że „ekspresja genu OXT (...) w grupie pacjentów (...) obniża się wraz z czasem trwania choroby”. Niestety badanie ma charakter przekrojowy i nawet jeśli założymy, że pacjenci z długim czasem trwania choroby są dokładnym obrazem tego, jak będą wyglądali pacjenci z krótkim czasem choroby za kilka lat (choć nie musi tak się stać), to kompletnie nie wiemy czy w międzyczasie, np. w 5 lub 6 roku choroby ekspresja OXT gwałtownie się nie zwiększy, by potem ponownie ulec zmniejszeniu. Ta uwaga odnosi się do wszystkich zdań, w których doktorantka stosuje powyższy sposób wnioskowania. Ostatni strona Dyskusji przynosi garść refleksji autorki nt. ograniczeń badania, jednak wydają się one zbyt skromne i rozmyte. Sugerowałbym ich dobitniejsze wypunktowanie w późniejszych publikacjach. Badanie jest przekrojowe i ma charakter porównania grup klinicznych z grupą kontrolną, są one porównywalne pod względem wieku i płci, jednak na tym podobieństwa się kończą. Zakładam, że grupy mogą różnić się: pobieraniem leków przeciwpsychotycznych, paleniem tytoniu, masą ciała, zróżnicowaniem otoczenia, liczbą kontaktów towarzyskich, aktywnością seksualną, aktywnością fizyczną, a każda z tych zmiennych może wpływać na ekspresję peptydów prospołecznych.

W części 5 Rozdziału IV doktorantka przedstawia Wnioski, które są związłym powtórzeniem wyników. Moje uwagi odnośnie Wniosku 1 – objawy schizofrenii nie różnią się pomiędzy grupami, ponieważ prawdopodobnie w obu przypadkach mamy do czynienia z pacjentami hospitalizowanymi z zaostrzeniem objawów, Wniosek 2- należałoby ująć ostrożniej – ekspresja genów może mieć znaczenie, Wniosek 3 – Ekspresja genów nie koreluje z nasileniem objawów (..)

Rozdział IX stanowi spis piśmiennictwa liczący 268 pozycji, który jest adekwatny i aktualny, choć nie jest jasne dlaczego niektóre tytuły prac zapisane są wielkimi literami.

Ocena merytoryczna rozprawy

Przedmiotem pracy doktorskiej była próba oceny ekspresji genów dla peptydów prospołecznych w schizofrenii o niedawnym początku oraz u chorych z długim czasem trwania choroby. Poszukiwano również związków pomiędzy ekspresją wspomnianych genów, a wynikami w skalach psychometrycznych oraz występowaniem prób samobójczych. Do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczam:

1. Objęcie badaniem starannie wybranych i odpowiednio liczebnych populacji klinicznych oraz dobrze dobranej grupy kontrolnej
2. Zastosowanie nowoczesnych metod badań transkryptomicznych
3. Dokonanie całościowego przeglądu piśmiennictwa dotyczącego badanego zagadnienia
4. Przedstawienie wyników w jasny i czytelny sposób
5. Ciekawą i obszerną dyskusję

Większość zastrzeżeń i uwag krytycznych zawarłem w streszczeniu pracy, natomiast inne drobne uwagi to: pojedyncze błędy interpunkcyjne oraz niekonsekwentne posługiwanie się zapisem piśmiennictwa et al. lub i wsp., w języku polskim należałoby stosować ten pierwszy wariant.

## Podsumowanie

Autorka rozprawy doktorskiej samodzielnie zaprojektowała badanie, zrealizowała jego cele i dokonała dyskusji wyników. Na uwagę zasługuje podjęcie zagadnienia badanego dotychczas w Polsce tylko w pojedynczych pracach. Uzyskane wyniki, choć ciekawe powinny być traktowane z ostrożnością. Niemniej, w przypadku ich powtórzenia i znalezienia biologicznych mechanizmów je tłumaczących, perspektywy ich wykorzystania wydają się niezwykle szerokie. Moje krytyczne uwagi zawarte powyżej nie zmieniają pozytywnej oceny całości dysertacji. Uważam, że rozprawa lek. Marty Broniarczyk-Czarniak spełnia kryteria pracy na stopień doktora nauk medycznych zgodnie z wymogami określonymi w ustawie z dnia 14 marca 2003 zmodyfikowanej ustawą z dnia 18 marca 2011, o tytule naukowym i stopniach naukowych. W związku z powyższym stawiam wniosek do Rady Wydziału

Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Marty Broniarczyk-Czarniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Filip Rybakowski



