

Kraków, 16.05.2002r.

Prof. dr hab. n. o zdr. Marta Makara-Studzińska
Kierownik Zakładu Psychologii Zdrowia
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
e-mail: marta.makara-studzinska@uj.edu.pl

Ocena rozprawy doktorskiej

lek med. Ewy Gromniak - Hanieckiej pt. „ Neuroplastyczność a zaburzenia depresyjne. Znaczenie genów: ELAVL1, REST, HOMER, MKL1 i MKL2.”

Promotor: prof. dr hab. Piotr Gałecki

Zaburzenia depresyjne należą do jednych z najpoważniejszych chorób psychicznych, o heterogennym modelu dziedziczenia i zwiększającym się corocznie odsetku zachorowań. Etiologia zaburzeń depresyjnych wciąż pozostaje nie do końca poznana, przyjmuje się, iż jest uwarunkowana wieloczynnikowo. Nadal prowadzone są badania identyfikujące wpływ ekspresji różnych genów na powstawanie i rozwój zaburzeń depresyjnych. Coraz częściej podnosi się rolę zjawiska neuroplastyczności w zaburzeniach depresyjnych. Wciąż badany jest wpływ czynników genetycznych na rozwój mózgu, różnicowanie neuronów na ich związek z depresją. Depresja należy obecnie do jednych z najczęściej występujących chorób psychicznych na świecie i w Polsce. Aktualne źródła podają, że na świecie choruje już około 350 miliona ludzi, co stanowi około 4% wszystkich zachorowań. W Polsce na depresję choruje około 1,5 miliona osób, w tym około 3% osób w grupie osób pracujących do 65 roku życia. Dostępne badania podają, że wśród osób chorujących na depresję 40-80% ujawnia myśli samobójcze, 20-60% z nich podejmuje próby samobójcze a 15% chorych odbiera sobie życie. Według danych WHO prawdopodobnie do 2030 roku depresja będzie prawdopodobnie uznawana za najczęściej występującą chorobę na świecie. Etiologia zaburzeń depresyjnych nadal nie jest do końca odkryta. W rozwoju zaburzeń depresyjnych ważną rolę pełnią zarówno

czynniki genetyczne, biochemiczne, strukturalne jak i środowiskowe.

W depresji naukowcy wskazują, że dochodzi do neurodegeneracji, nasilenia procesu wymierania neuronów, zmniejszenia ilości powstawania nowych neuronów. Depresję opisuje się jako awarię w neuronach, szczególnie w układzie połączeń pomiędzy korą przedczołową, zespołem jąder migdałowych i hipokampem. Utrata neuroplastyczności struktur mózgu związana jest z czynnością kontrolowania nastroju. Z całą pewnością, znalezienie odpowiedzi na te problemy wymaga wielu jeszcze badań. Do tej pory w Polsce nie prowadzono badań oceniających znaczenie ekspresji badanych genów pod względem płci, wieku, wykształcenia czy nasilenia zaburzeń depresyjnych. Stąd też projekt badawczy Doktorantki stanowi cenne uzupełnienie dotychczasowego stanu badań. Autorka zaprojektowała interesujące badanie, mające na celu poznanie związku pomiędzy ekspresją na poziomie mRNA oraz na poziomie białka dla wybranych genów a występowaniem zaburzeń depresyjnych, nasileniem objawów depresji i przebiegiem klinicznym choroby.

Rozprawa liczy 166 strony, zawiera 63 tabele, 54 rycin, , spis skrótów oraz wykaz załączników (Zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu medycznego w Łodzi, zastosowane narzędzia badawcze). Rozprawę wieńczy obszernie piśmiennictwo (102 pozycji, w tym 78 publikacji z ostatnich 10 lat) oraz streszczenia pracy w języku polskim i angielskim.

Przedłożona praca doktorska dotyczy oceny ekspresji na poziomie mRNA i na poziomie białka dla genów ELAVL4, HOMER, REST, MKL1, MKL2 w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi, grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością oraz w grupie osób zdrowych. Kolejnym celem jest ocena związku między ekspresją na poziomie mRNA i na poziomie białka dla genów ELAVL4, HOMER, REST, MKL1, MKL2 a zmiennymi klinicznymi i socjodemograficznymi w tych samych grupach osób. Dysertację opracowano na podstawie analizy dostępnej literatury przedmiotu oraz w oparciu o wyniki przeprowadzonych innowacyjnych badań. Praca ma budowę typową dla prac empirycznych.

Część teoretyczna rozprawy jest obszerna i w pełni umożliwia postawienie szczegółowych celów badawczych, opracowanie założeń o wzajemnych zależnościach oraz wskazuje na kierunki wnioskowania. W części teoretycznej Autorka zaprezentowała zaburzenia depresyjne w ujęciu historycznym, przeprowadziła rozważania definicyjne, wskazała

charakterystykę kliniczną zaburzeń depresyjnych z uwzględnieniem podziału, epidemiologii, etiologii oraz kryteriów diagnostycznych. Omówiła także występowanie zaburzeń depresyjnych w chorobach depresyjnych, znaczenie lekooporności, neurobiologie, zjawisko neuroplastyczności oraz scharakteryzowała geny ELAVL4, HOMER, REST, MKL1 i MKL2.

Rozważania Doktorantki są merytoryczne, charakteryzują się wnikliwością, szczegółowością oraz świadczą o dużym znawstwie problematyki. Ta część jest napisana poprawnie pod względem językowym oraz w sposób komunikatywny. Wywód teoretyczny jest poprowadzony w sposób logiczny i uporządkowany.

Część empiryczna oznaczona jako rozdział czwarty ma charakter empiryczny. Przedstawiono w nim przygotowany projekt badawczy, opisano cel pracy, cel szczegółowe, zaprezentowano materiał i metody badawcze. Przedstawiono organizację badań własnych. Zaprezentowano także wyniki, przeprowadzono ich dyskusję, wyciągnięto syntetyczne wnioski.

Doktorantka sformułowała następujące cele szczegółowe swojej pracy badawczej:

1. Ocena ekspresji na poziomie mRNA i na poziomie białka dla genów ELAVL4, HOMER, REST, MKL1 i MKL2 w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi i w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi z towarzyszącymi chorobami somatycznymi oraz w grupie kontrolnej.
2. Ocena związku między ekspresją na poziomie mRNA i na poziomie białka dla genów ELAVL4, HOMER, REST, MKL1 i MKL2 a zmiennymi klinicznymi i socjodemograficznymi w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi i w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi z towarzyszącymi chorobami somatycznymi oraz w grupie kontrolnej.

W badaniach Doktorantka wykorzystał następujące narzędzia badawcze:

1. Autorska ankieta nazwana: Ankieta personalną, służyła w pozyskaniu danych demograficznych, informacji o przebiegu choroby i jej leczeniu. Podczas przeprowadzania ankiety uzyskano szczegółowe informacje od osób z grupy badanej I i II oraz od osób z grupy kontrolnej dotyczące: wieku, płci, wykształcenia, miejsca zamieszkania. Dodatkowo od osób z grupy badanej I i II uzyskano informacje dotyczące rozpoznania choroby według obowiązującej Klasyfikacji Zaburzeń Psychiczych i Zaburzeń Zachowania ICD-10, czasu trwania choroby, ilości przebytych epizodów depresji, wcześniejszych hospitalizacji psychiatrycznych, stosowanego leczenia psychiatrycznego
2. Skala Depresji Hamiltona (Hamilton Depression Rating Scale, HDRS) opracowana przez Maxa Hamiltona należy do powszechnie używanych narzędzi oceniających stopień ciężkości zaburzeń depresyjnych i oceny skuteczności stosowanego leczenia przeciwdepresyjnego. Kwestionariusz HDRS składa się z 17 lub 21 pytań. Dla potrzeb niniejszego badania zastosowano 17 punktową wersję skali.

Przed przystąpieniem do badań Doktorantka uzyskała zgodę na przeprowadzenie badania wydana przez Komisję Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr RNN 136/18/KE z dnia 15 maja 2018r. Projekt badań oparto na założeniach longitudinalnego procesu badawczego.

Projekt naukowy obejmował następujące etapy badawcze:

1. Rekrutacja osób badanych. Badanie zostało przeprowadzone w Klinice Psychiatrii Dorosłych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i w Wojewódzkim Szpitalu dla Nerwowo i Psychicznie Chorych w Świeciu w okresie od 19 lipca 2018. W badaniu wzięło udział łącznie 184 osoby w wieku od 18-65 lat, w grupie badanie I (N=68), w grupie badanej II (N=67) i w grupie kontrolnej (N=49). Wszyscy badani byli rodowitymi, niespokrewnionymi Polakami, zdolnymi do wyrażenia świadomej zgody. Każda z osób została poinformowana, że udział w badaniu jest dobrowolny, uzyskane dane osobowe i wyniki nie będą rozpowszechnione a jedynie wykorzystane dla potrzeb prowadzonej pracy badawczej.

Wszystkie osoby po zapoznaniu się z formularzem świadomej zgody, wyjaśnieniu niezrozumiałych terminów, odpowiedzi na zadane pytania poproszone zostały o podpisanie

świadomej zgody na udział w prowadzonej pracy badawczej.

2. Etapy badania ankietowego i badania krwi: Osoby biorące udział w badaniu z grupy badanej I i II otrzymywały farmakologiczne leczenie przeciwdepresyjne. Udział w badaniu nie był związany ze zmianą prowadzonego leczenia. Osoby z grupy badanej I i II spełniały kryteria rozpoznania zaburzeń depresyjnych nawracających, epizodu depresyjnego lub organicznych zaburzeń depresyjnych, rozpoznanych według obowiązującej klasyfikacji ICD-10.

Nasilenie objawów zaburzeń depresyjnych w grupach badanych I i II oceniane było dwukrotnie za pomocą Skali Depresji Hamiltona w dniu włączenia do badania po uzyskaniu odpowiedzi na leczenie (średnio po 8-10 tygodniach terapii). U wszystkich pacjentów w grupach badanych III oceniany był czas trwania choroby, wiek zachorowania, liczba przeżytych epizodów depresyjnych według ustalonych metod badania. Kryterium wykluczającym udział w badaniu było rozpoznanie choroby nowotworowej, poważnej choroby neurologicznej, przewlekłej choroby o podłożu zapalnym.

Od wszystkich osób biorących udział w badaniu pobrana została krew dwukrotnie przez wykwalifikowany personel medyczny, w dniu włączenia do badania oraz po uzyskaniu odpowiedzi na leczenie, każdorazowo w ilości 10ml - 2 probówki o objętości 5ml. Krew żylna była pobierana na czczo, przy użyciu sterylnego sprzętu jednorazowego użytku. Probówka na wykrzepianie została zamrożona w temperaturze minus 20°C. Probówka z EDTA została odwirowana w parametrach: 1500 x g przez 10 minut w temperaturze 4°C; osocze i osad zostały zebrane do osobnych probówek typu Eppendorf o pojemności 2ml i zostały zamrożone w temperaturze minus 20°C. Wirówka laboratoryjna - model MPW-35IR, rok produkcji 2009. Pobrany materiał badawczy został opracowany w Katedrze i Zakładzie Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Izolację całkowitego RNA z krwi pacjentów i kontroli wykonano zestawem InviTrap Spin Universal RNA Kit (Stratec molecular, Berlin Niemcy) zgodnie z zaleceniami producenta. 300 pl krwi w probówce inkubowano z 300 pl Lysis/Binding Buffer. Do lizatu komórkowego dodano 300 pl mieszaniny kwaśny fenol:chloroform a po wymieszaniu próbkę wirowano (5 min., 10000xg) w celu oddzielenia fazy wodnej od fazy organicznej. Frakcję górną (wodną) przeniesiono do świeżej probówki, zawierającej 375 pl 96% etanolu i po wymieszaniu całość przelano do probówki zawierającej kolumnę z filtrem. Po odwirowaniu (15 s., 10000xg) kolumnę z filtrem przeniesiono do świeżych probówek

i płukano w 700 μ l RNA Wash Solution 1, a następnie wirowano (10 s., 10000xg). Kolumnę z filtrem przemywano dwukrotnie w 500 μ l Wash Solution 2/3 i wirowano (1 min., 10000xg). Kolumnę z filtrem umieszczono w świeżej probówce a wyizolowane RNA eluowano 30 μ l wody wolnej od nukleaz o temperaturze 95°C poprzez wirowanie (30 s., 10000xg). Absorbancję mierzono za pomocą spektrofotometru (Picodrop) przy $\lambda = 260$ nm a stężenie całkowitego RNA odczytywano z tabeli. Wyizolowane RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

Zastosowane przez Doktorantkę narzędzia badawcze oraz metodyka badań w ocenie Recenzenta zostały użyte prawidłowo, odpowiednio i adekwatnie. Zastosowane testy statystyczne są poprawne i wskazują na bardzo duże umiejętności Doktorantki w tym obszarze. Opracowanie statystyczne i graficzne wykonano używając programu Statistica 13. Za najniższy poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$. Referowanie wyników badań jest logiczne, staranne i przejrzyste. Wnikliwa analiza statystyczna zgromadzonych danych empirycznych prowadzi do wartościowych wniosków i ciekawej dyskusji. Doktorantka świetnie poradziła sobie z bardzo dużą liczbą szczegółowych informacji zawartych w materiale badawczym, które zaprezentowała i opisała w syntetyczny sposób, co pozwoliło na wykrycie zasadniczych prawidłowości występujących w badanej populacji. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały istotne statystycznie różnice w badanej zbiorowości w zmiennych takich jak : strukturze płci - najczęściej kobiet brało udział w badaniu w grupie osób zdrowych; wykształcenia - najczęściej osób z wykształceniem średnim było w grupie osób zdrowych a najmniej w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością; wieku - najmłodsze osoby były w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi a najstarsze w grupie z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością; liczby epizodów, która była istotnie statystycznie wyższa w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością. Analizy statystyczne porównujące badane grupy wskazały istotne statystycznie różnice w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi i osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością w porównaniu do osób zdrowych dla ekspresji genu ELAVL4, MKL1, REST, HOMER zarówno na poziomie białka jak i na poziomie mRNA a dla genu MKL2 jedynie na poziomie mRNA. Uzyskanie przez Doktorantkę wyniki badania nie ujawniają wpływu liczby epizodów i wykształcenia, struktury

płci na ekspresję genu HOMER zarówno na poziomie białka jak i na poziomie mRNA. Wykazano natomiast zależność dotyczącą wpływu wieku na ekspresję genu HOMER. Wraz ze wzrostem wieku wzrasta ekspresja HOMER zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białka. Wśród badanych genów, także ELAVL4 wpływając na procesy plastyczności zachodzące w strukturach mózgu, może odgrywać również ważną rolę w powstawaniu nowych terapii przeciwdepresyjnych. Wyniki badań w mojej pracy wskazują na brak wpływu liczby epizodów, płci i wykształcenia na ekspresję genów ELAVL4 zarówno na poziomie białka jak i na poziomie mRNA ale wskazują na istotne statystycznie zmniejszenie ekspresji genu ELAVL4 na poziomie białka i na poziomie mRNA u osób z zaburzeniami depresyjnymi w porównaniu do osób zdrowych. Może to potwierdzać znaczenie ELAVL4 w procesie patogenezy zaburzeń depresyjnych. Ponadto Doktorantka wykazała istotne statystycznie zmniejszenie ekspresji genu REST na poziomie białka w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi i osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością w porównaniu do osób zdrowych, natomiast na poziomie mRNA wykazano istotne statystycznie wyższą ekspresję dla genu REST w tych samych badanych grupach. Analizy wyników badań wskazują na brak wpływu liczby epizodów, wieku, płci, wykształcenia na ekspresję genów REST zarówno na poziomie białka jak i na poziomie mRNA. Uzyskane przez Autorkę Dysertacji wyniki dowodzą znaczenia genu MKL1, MKL2 w zaburzeniach depresyjnych z zachodzącymi procesami neurogenezy i plastyczności. Uzyskano także istotne statystycznie zmniejszenie ekspresji genu MKL1 na poziomie białka i na poziomie mRNA i zmniejszenie ekspresji genu MKL2 na poziomie mRNA u osób z zaburzeniami depresyjnymi i osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością w porównaniu z grupą osób zdrowych, ale bez zależności statystycznej na poziomie białka dla genu MKL2 w tych samych grupach. Struktura płci posiada istotny statystycznie wpływ na ekspresję genu MKL1 na poziomie białka w grupie osób zdrowych. Nie wykazano związku liczby epizodów, poziomu wykształcenia, wieku z ekspresją genów MKL1, MKL2 zarówno na poziomie białka jak i na poziomie mRNA w badanych grupach.

W dyskusji wyników Autorka odniosła się do wyników innych badań starając się pokazać na ich tle swoje rezultaty. Dyskusja przeprowadzona jest bardzo rzeczowo i dokładnie, co świadczy o dobrym warsztacie naukowym. Literatura przedmiotu, będąca podstawą pracy jest obszerna i aktualna.

Na podstawie analizy wyników badania sformułowano następujące wnioski:

1. Ekspresja genów HOMER, ELAVL4, REST, MKL1, MKL2 ma znaczenie w patogenezie zaburzeń depresyjnych, w szczególności:
 - a. Ekspresja genu ELAVL4 na poziomie mRNA i na poziomie białka jest niższa w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi i grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością w porównaniu z osobami zdrowymi.
 - b. Ekspresja genu HOMER na poziomie mRNA i na poziomie białka jest najwyższa w grupie osób zdrowych w porównaniu z grupą osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością i grupą osób z zaburzeniami depresyjnymi.
 - c. Ekspresja genu REST na poziomie mRNA jest wyższa w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi i grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością w porównaniu z osobami zdrowymi natomiast na poziomie białka jest niższa w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi i grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością w porównaniu z osobami zdrowymi.
 - d. Ekspresja genu MKL1 na poziomie mRNA i na poziomie białka jest niższa w grupie osób z osobami z zaburzeniami depresyjnymi i grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością w porównaniu z osobami zdrowymi.
 - e. Ekspresja genu MKL2 na poziomie mRNA jest niższa w grupie osób z zaburzeniami depresyjnymi i osób z zaburzeniami depresyjnymi ze współchorobowością w porównaniu z osobami zdrowymi natomiast na poziomie białka nie wykazuje istotności statystycznej.

2. Wiek wykazuje dodatnią korelację na ekspresję genu HOMER na poziomie białka i na poziomie mRNA w grupie osób zdrowych.
3. Poziom wykształcenia i liczba epizodów depresyjnych nie wpływa istotnie statystycznie na ekspresję genów ELAVL4, REST, HOMER, MKL1, MKL2 zarówno na poziomie białka jak i na poziomie mRNA.
4. Płeć posiada istotny statystycznie wpływ na ekspresję genu MKL1 na poziomie białka w grupie osób zdrowych.

Doktorantka dokonała także krytycznej analizy swoich badań, dowodząc świadomości ich ograniczeń. Kolejność rozdziałów jest poprawna. Rozprawa doktorska została zredagowana w sposób typowy dla prac o charakterze empirycznym - część teoretyczna i empiryczna jako sprawozdanie z badań wraz z dyskusją i wnioskami. Praca została zredagowana bardzo starannie i poprawnie. Błędy literowe i stylistyczne zdarzały się niezmiernie rzadko. Z formalnego punktu widzenia oceniana rozprawa jest napisana poprawnie. Podstawy teoretyczne, plan badań i jego realizacja nie budzą żadnych zastrzeżeń, a wręcz przeciwnie wskazują na bardzo duże kompetencje Doktorantki. W ocenie Recenzenta jest to najciekawszy rozdział rozprawy doktorskiej. Należy podkreślić, iż w realizacji programu badań oraz redagowaniu tekstu Doktorantka wykazała się doskonałym rozeznaniem zastanej wiedzy oraz dojrzałością warsztatu badawczego. Badania niewątpliwie były czasochłonne, wymagały pracowitości, dokładności i rzetelności. Zamierzony plan analiz został przeprowadzony konsekwentnie, z wykorzystaniem różnorodnych, zaawansowanych, adekwatnych metod analizy statystycznej, co zostało zaprezentowane w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani lek med. Ewy Gromniak-Hanieckiej pt., „Neuroplastyczność a zaburzenia depresyjne .Znaczenie genów :ELAVL1,REST, HOMER, MKL1 i MKL2.” spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003r.o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 poz.1789). Dysertacja doktorska spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, to jest stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego oraz dowodzi ogólnej wiedzy teoretycznej i umiejętności tworzenia warsztatu badawczego, dlatego mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie lek med. Ewy Gromniak-Hanieckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Maria Makara-Studzińska
specjalista psychologii klinicznej
specjalista zdrowia publicznego



