

Kraków, 27.05.20022r.

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. Józefiny Rawskiej pt. „Znaczenie genów: SLC6A4 i NPY w etiologii zaburzeń depresyjnych”.

Promotor: prof. dr hab. Piotr Gałecki

Światowa Organizacja Zdrowia szacuje, iż objawy depresji występują u 350 milionów ludzi na świecie. W Polsce występowanie depresji stanowi w przybliżeniu około 1,5 miliona osób. W Polsce w latach 2008-2011 przeprowadzono badanie EZOP, mające na celu ocenę częstości występowania zaburzeń psychicznych. Wyniki badań pokazały, że duża depresja (według DSM-IV) występowała u 3,0% badanych, istotnie częściej u kobiet - 4,0% niż u mężczyzn - 1,9%. Według danych IHME, w Polsce, na depresję w roku 2017 chorowało 2,8% populacji.

Zaburzenia depresyjne należą do 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. Podstawowy cel badań genetycznych w zakresie chorób psychicznych to próba określenia udziału czynników genetycznych w patogenezie tych chorób. Zaburzenia afektywne, jako choroba psychiczna, należą do tak zwanych „chorób złożonych”.

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 tej części Autorka przeprowadziła rozważania definicyjne, wskazała charakterystykę kliniczną zaburzeń depresyjnych z uwzględnieniem podziału, epidemiologii, etiologii oraz kryteriów diagnostycznych. Omówiła także występowanie zaburzeń depresyjnych w chorobach somatycznych i psychicznych oraz scharakteryzowała geny SLC6A4 i NPY. Doktorantka dokonała też syntezy podejścia biologicznego, psychologicznego i czynników środowiskowych w etiologii depresji.

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

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

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 wydaną przez Komisję Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Projekt naukowy obejmował następujące etapy badawcze:

1. Rekrutacja osób badanych, która została przeprowadzona 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 badanej I (N=68), w grupie badanej II (N=67) i w grupie kontrolnej (N=49). Wszyscy badani byli zdolni 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. Osoby badane po zapoznaniu się z formularzem świadomej zgody, wyjaśnieniu niezrozumiałych terminów, odpowiedzi na zadane pytania poproszone zostały o podpisanie świadomej zgody na udział w niniejszym projekcie badawczym.

2. Osoby z grup badanych (trzy grupy w tym grupa kontrolna) poproszono o wypełnienie autorskiej ankiety. Analizowano w niej wiek, miejsce zamieszkania, wykształcenie, wcześniejsze leczenie psychiatryczne, rozpoznanie choroby psychicznej, liczba przebytych epizodów choroby, obecność schorzeń somatycznych. Osoby badane podzielono na dwie grupy eksperymentalne (grupa I i II).

3. Następnie pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi podzielono na dwie grupy: osoby ze współwystępującymi schorzeniami somatycznymi i bez współwystępowania takich chorób. Wszyscy uczestnicy badania zostali poproszeni o wypełnienie ankiet zawierających dane socjodemograficzne. Stopień nasilenia depresji oceniano za pomocą wykonywanej dwukrotnie skali Hamiltona: w dniu włączenia do badania i w dniu zakończenia badania.

4. Od uczestników badania pobrano krew żylną dwukrotnie, w łącznej objętości 10 ml, w dniu włączenia do badania oraz po uzyskaniu odpowiedzi na leczenie. Materiał został opracowywany w Katedrze i Zakładzie Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. DNA zostało wyizolowane z krwi pełnej. Pobrana krew posłużyła do badania oceny ekspresji na poziomie mRNA i na poziomie białka dla analizowanych genów. Dokonano izolacji całkowitego RNA oraz analizę jakości wyizolowanego RNA. Do oceny ekspresji genów na poziomie mRNA wykorzystano metodę odwrotnej transkrypcji RT-PCR oraz reakcję Real-Time PCR; do oceny ekspresji genów na poziomie białka i oceny stężenia białka wykorzystano test immunoenzymatyczny (ELISA).

W celu wykazania istotności statystycznej różnic pomiędzy ekspresją na poziomie mRNA i na poziomie białka dla wybranych genów w grupach badanych i w grupie kontrolnej wykonano analizę statystyczną. Opracowanie statystyczne i graficzne wykonano używając programu Statistica 13, za najniższy poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$. W pracy zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitneya do porównania grup badawczych oraz testy: nieparametryczny Anova (rang) Kruskala-Wallis i test Dunna do porównania w grupach. Do oceny jednorodności wariancji zastosowano test Levene'a. Analizę statystyczną badanych cech niemierzalnych wykonano w oparciu o nieparametryczny test Chi² Pearsona. W pracy zastosowano współczynnik korelacji kolejnościowej (rang) Spearmana.

Zastosowane przez Doktorantkę narzędzia badawcze oraz metodyka badań w ocenie Recenzenta zostały użyte prawidłowo, odpowiednio i adekwatnie. Zastosowane testy analizy statystycznej 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 $p < 0,05$.

W ocenie Recenzenta na uwagę zasługuje doskonale referowanie wyników badań, wnikliwa analiza statystyczna zgromadzonych danych empirycznych oraz ciekawa dyskusja. Doktorantka świetnie poradziła sobie z bardzo dużą liczbą szczegółowych informacji zawartych w materiale badawczym, które zaprezentowała 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 : płeć, wykształcenie, liczba epizodów depresyjnych.

Uzyskane wyniki posłużyły do oceny znaczenia polimorfizmu i ekspresji badanych genów SLC6A4 i NPY w etiologii zaburzeń depresyjnych, co może przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat etiopatogenezy tych zaburzeń oraz do jej wykorzystania w wyłonieniu grup ryzyka oraz opracowania potencjalnych nowych metod terapeutycznych. W przeprowadzonym badaniu wykazano, iż ekspresja analizowanych genów na poziomie mRNA i na poziomie białka dla genów SLC6A4 i NPY ma istotne znaczenie w etiologii zaburzeń depresyjnych. Wyniki przeprowadzonego badania pokazują istotny statystycznie wzrost ekspresji na poziomie mRNA i na poziomie białka dla genu SLC6A4. Ekspresja jest wyższa w obu grupach badanych w porównaniu do grupy kontrolnej. Ekspresja na poziomie mRNA i na poziomie białka dla genu NPY jest natomiast niższa w grupach badanych osób z zaburzeniami depresyjnymi, zarówno z chorobami somatycznymi jak i bez współistniejących chorób somatycznych, a grupą kontrolą. Analiza statystyczna wykazała, iż ekspresja na poziomie mRNA dla genu SLC6A4 jest zależna od płci jedynie w grupie osób z zaburzeniami somatycznymi i dotyczy tylko płci męskiej. Natomiast ekspresja na poziomie mRNA dla genu SLC6A4 w grupie osób bez zaburzeń somatycznych jest niezależną od płci. Wpływ ekspresji na poziomie białka dla genu SLC6A4 jest niezależny od płci, zarówno w grupie osób z zaburzeniami somatycznymi, jak i w grupie osób bez zaburzeń somatycznych. Wpływ ekspresji na poziomie mRNA i na poziomie białka dla genów SLC6A4 i NPY na rozwój zaburzeń depresyjnych jest niezależny od wieku i wykształcenia.

Wyniki badań wskazują jednak, iż nie istnieje również zależność pomiędzy ekspresją na poziomie mRNA i na poziomie białka dla genów SLC64 i NPY a liczbą epizodów depresji. Wyniki badań pokazują, iż nie istnieje różnica w nasileniu objawów depresyjnych w dniu włączenia do badania w grupach badanych; grupy osób z zaburzeniami depresyjnymi bez chorób somatycznych i z chorobami somatycznymi są pod tym względem porównywalne. Wykazano jednak, iż leczenie farmakologiczne uzyskuje ten sam skutek w obu grupach badanych. Analiza wykazała bowiem istotną statystycznie różnicę średniego nasilenia objawów depresyjnych w grupach badanych ocenianych przy użyciu skali depresji Hamiltona w dniu włączenia badania i w dniu jego zakończenia: czyli średnie nasilenie ocenianych objawów zaburzeń depresyjnych w obu grupach badanych było mniejsze przy ocenie w dniu zakończenia badania.

2. Ekspresja genu SLC6A4 na poziomie mRNA u osób z depresją ze współistniejącymi zaburzeniami somatycznymi jest zależna od płci.

3. Nasilenie epizodu depresji nie wpływa w sposób istotny na ekspresję genów SLC6A4 i NPY.

4. Wiek, wykształcenie, liczba epizodów dla genów SLC6A4 i NPY nie wpływa istotnie statystycznie na ekspresję genów zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białka.

Jako Recenzent pragnę podkreślić, iż Doktorantka dokonała 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. Należy podkreślić, iż w realizacji programu badań oraz redagowaniu tekstu Autorka wykazała się doskonałym rozeznanem 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 i adekwatnych metod analizy statystycznej, co zostało zaprezentowane w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani lek med. Józefiny Rawskiej pt. „Znaczenie genów: SLC6A4 i NPY w etiologii zaburzeń depresyjnych” 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. Józefiny Rawskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marta Makara-Studzińska
Prof. dr hab. Marta Makara-Studzińska
specjalista psycholog kliniczny
specjalista zdrowia publicznego