

Kraków, dn. 03. 07. 2023 r.

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

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Marii Kozłowiec pt. „*Znaczenie ekspresji genów kodujących receptory estrogenowe: ESR1 i ESR2 w zaburzeniach depresyjnych*”**

**Promotor: prof. dr hab. n. med. Piotr Galecki**

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. Depresja to powszechne zaburzenie psychiczne, stanowiące jedną z najczęstszych przyczyn niepełnosprawności wynikającej ze stanu zdrowia.

Istnieje wiele teorii dotyczących przyczyn zaburzeń depresyjnych, jest to choroba wieloczynnikowa, która ma podłoże biologiczne, psychologiczne i społeczne. Jest przedmiotem licznych badań naukowych i publikacji. Aktualnie rośnie zainteresowanie naukowców rolą hormonów płciowych i ich wpływem na układy inne niż rozrodczy, w tym funkcjonowanie psychiczne. Estrogeny działając poprzez receptory ESR1 i ESR2 mogą uczestniczyć w regulacji nastroju i funkcji poznawczych. W Polsce brak jest badań nad ekspresją receptorów estrogenowych u pacjentów z depresją w połączeniu z ich funkcjonowaniem poznawczym. Większość publikacji w tym temacie dotyczy modelu zwierzęcego. Stąd też projekt badawczy Doktorantki stanowi cenne uzupełnienie dotychczasowego stanu badań. Autorka zaprojektowała interesujące badanie, mające na celu poznanie ekspresji genów kodujących receptory estrogenowe ESR1 i ESR2, na poziomie mRNA i na poziomie białka, ocena funkcjonowania poznawczego oraz przebiegu klinicznego w grupie pacjentów z rozpoznaniem zaburzeń depresyjnych.

Rozprawa doktorska liczy 121 strony, zawiera 24 tabele, 2 ryciny, 11 wykresów, spis skrótów, spis tabel, rycin, wykresów oraz wykaz załączników: Zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, RNN/135/18/KE Numer RNN/384/11/KB z dnia 17 maja 2011 r. oraz zastosowane narzędzia badawcze. Rozprawę wieńczy obszerne piśmiennictwo (126 pozycji, w większości pozycji z ostatnich 10 lat) oraz streszczenia pracy w języku polskim i angielskim.

Dysertację opracowano na podstawie analizy dostępnej literatury przedmiotu oraz w oparciu o wyniki przeprowadzonych innowacyjnych badań własnych. 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 dokonała charakterystyki zaburzeń depresyjnych i badanych genów, a także opisała wybrane funkcje poznawcze ze szczególnym uwzględnieniem cech funkcjonowania poznawczego pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi. Rozważania Doktorantki są merytoryczne, charakteryzują się wnikliwością, szczegółowością oraz świadczą o dużym znawstwie problematyki. Ta część rozprawy doktorskiej napisana jest poprawnie pod względem językowym i jest niezmiernie ważne w sposób komunikatywny. Wywód teoretyczny jest poprowadzony w sposób logiczny i uporządkowany.

W części empirycznej Doktorantka zaprezentowała metodologię swojego projektu badawczego, podając cel i założenia pracy. Opisała także materiał i zastosowane narzędzia badawcze. Dokładnie przedstawiła organizację badań własnych. Zaprezentowała wyniki, przeprowadziła ich dyskusję oraz wyciągnęła syntetyczne wnioski. W przedłożonej pracy doktorskiej Doktorantka postawiła sobie pytanie, czy ekspresja na poziomie mRNA i na poziomie białka genów kodujących receptory estrogenowe ESR1 i ESR2 jest różna w grupie osób doświadczających depresji (grupie eksperymentalnej) i w grupie osób zdrowych (grupie kontrolnej). Następnie, w grupie osób z depresją sprawdziła, czy istnieje związek między ekspresją badanych genów a zmiennymi takimi jak płeć, wiek oraz przebieg kliniczny choroby.

Ponadto Doktorantka postanowiła sprawdzić, czy występuje związek między funkcjonowaniem poznawczym a ekspresją na poziomie mRNA i na poziomie białka wybranych genów w grupie pacjentów z rozpoznaniem depresji oraz w grupie zdrowych osób. Analizowała także zależność między funkcjonowaniem poznawczym badanych a zmiennymi (wiek, płeć, wykształcenie) oraz przebiegiem klinicznym choroby. Dodatkowo w swoich badaniach wyodrębniła grupę kobiet w wieku okołomenopauzalnym (45-65 lat) i dokonała oceny ekspresji badanych genów i funkcjonowania poznawczego w tej grupie wiekowej.

Do badania Doktorantka zakwalifikowała 236 osób polskiej populacji w wieku 19-64. Grupa badana (eksperymentalna) liczyła 131 osób. Do grupy badanej włączono osoby z rozpoznaniem epizodu depresji lub zaburzeń depresyjnych nawracających (F32 lub F33 wg ICD-10), które były hospitalizowane w Klinice Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Do grupy kontrolnej zrekrutowano 105 zdrowych ochotników.

Osobom zakwalifikowanym do badania pobrano krew w ilości 5 ml w celu wykonania badań genetycznych. Przeprowadzono reakcję RT-PCR w celu oceny ekspresji genów ESR1 i ESR2 na poziomie mRNA i test ELISA w celu oceny ekspresji genów na poziomie białka. Do oceny ekspresji genów kodujących receptory estrogenowe pobierana była krew przez wykwalifikowany personel medyczny. Oznaczenia zostały wykonane w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej UM w Łodzi.

Od wszystkich uczestników badania zebrano dane socjodemograficzne (wiek, płeć, poziom wykształcenia) i przeprowadzono testy oceniające funkcje poznawcze przy pomocy testów neuropsychologicznych takich jak: test Stroopa, test łączenia punktów Reitana, test fluencji słownej i test krzywej uczenia się Łurii. Dodatkowo, w grupie osób z depresją uzyskano dane kliniczne dotyczące przebiegu choroby i przeprowadzono ocenę nasilenia depresji przy użyciu skali Hamiltona.

Test łączenia punktów Reitana A i B (Trail Making Test A & B, TMT) składa się z dwóch części (A i B). Test pozwala ocenić wzrokowo-przestrzenne aspekty pamięci operacyjnej, sprawność uwagi. TMT-A bada szybkość psychomotoryczną i funkcje wzrokowo-przestrzenne. TMT-B sprawdza dodatkowo umiejętność przełączania się na nowe kryterium wykonywania zadania oraz umiejętność hamowania uprzednio wyuczonej zasady. Część B testu angażuje procesy wzrokowo-przestrzennej pamięci operacyjnej. Test Stroopa (Stroop Color-Word Interference Test) używany jest przede wszystkim do oceny werbalnej pamięci operacyjnej oraz efektywności procesów uwagi. Test składa się z dwóch części: RCNb (*reading color name in black*) i NCWd (*naming color of word-different*). Test ten pozwala ocenić umiejętności wyuczenia jednego sposobu działania i możliwości przerwania się na inny model, podczas gdy pierwszy jest nadal przypominany.

Test Fluencji Słownej (Verbal Fluency Test) służy do oceny umiejętności tworzenia i płynnego wypowiedzenia słów zgodnie z podanym kryterium. Składa się z trzech części. Dwie pierwsze zawierają kategorie semantyczne, badają fluencję semantyczną, zaś w trzecia część bada fluencję fonemową. Fluencja fonemową opiera się głównie na funkcjach wykonawczych takich jak: planowanie motoryczne, selekcja pojęć, hamowanie strategii semantycznych i kontroli wykonania, angażuje także pętlę fonologiczną pamięci roboczej. Fluencja semantyczna wymaga zaangażowania głównie pamięci semantycznej

Krzywa Uczenia się Łurii służy do oceny pamięci słuchowej bezpośredniej, pamięci odroczonej oraz efektywności procesów uczenia się.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Dobór do grupy badanej był losowy. Wszyscy uczestnicy badania podejmowali dobrowolną, świadomą decyzję po uprzednim zapoznaniu się z celami badania. Analizy statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu programu SPSS wersja 23. Z jego pomocą wykonano analizę podstawowych statystyk opisowych, testy t-Studenta, C/-Manna-Whitneya, testy  $\chi^2$ , testy Kruskalla-Wallisa, korelacje Pearsona oraz analizy regresji liniowej. Za poziom istotności w niniejszym rozdziale uznano  $\alpha < 0,05$ . Przyjęto wyniki na poziomie istotności  $0,05 < p < 0,99$  za istotne na poziomie tendencji statystycznej. W celu zwiększenia przejrzystości wyników Doktorantka zastosowała dwa modele regresji liniowej, które przedstawiały poziom dopasowania do danych. Modele wykonano dla grupy osób chorych na depresję.

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.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła swoje wyniki badań. Odnosząc się do pierwszej hipotezy badawczej, w badaniach własnych Doktorantka odnotowała, że osoby chorujące na depresję cechowały się wyższym niż osoby zdrowe poziomem ekspresji ESR1 zarówno na poziomie mRNA jak i białka (ESR1, tendencja). Doktorantka wykazała także, że ekspresja genu ESR1 na poziomie mRNA może mieć związek z funkcjonowaniem poznawczym. Pośród wszystkich osób badanych poziom ekspresji ESR1 (mRNA) korelował negatywnie z wynikami w kolejnych pomiarach testu Łurii, fluencji słownej i teście łączenia punktów. Natomiast odnotowano pozytywne korelacje z wynikami w teście Stroopa A (czas) i obydwoma wynikami w teście Stroopa B. Ponadto poza wynikami testu łączenia punktów, pozostałe skale zgodnie sugerują, że im wyższy poziom ekspresji ESR1 na poziomie mRNA tym gorsze rezultaty w skalach oceniających funkcje kognitywne uczestników. W odniesieniu do poziomu ekspresji ESR2 (mRNA) zaobserwowano umiarkowaną negatywną korelację z wynikami w testach Stroopa B oraz TMT A. Odnosząc się do konkretnych grup badanych, w grupie osób z depresją odnotowano negatywną korelację między ekspresją ESR1 (mRNA) i niektórymi wynikami w teście Łurii oraz pozytywną korelację z wynikami w teście Stroopa A (czas) i Stroopa B (błędy) oraz wynikiem testu łączenia punktów. Otrzymane wyniki, tak jak w przypadku oceny całej grupy badanych, pozwalają przypuszczać, że wyższa ekspresja ESR1 na poziomie mRNA może wiązać się z gorszym funkcjonowaniem poznawczym. Również badanie przez Doktorantkę ekspresji ESR2 (mRNA) w grupie osób z depresją dostarczyło ciekawych danych. Poziom ekspresji tego genu koreluje negatywnie z wynikami testów Stroopa B oraz wynikami testu łączenia punktów. Poza tym Autorka dysertacji odnotowała pozytywną korelację z częścią wyników testów Łurii oraz fluencji słownej. Pozwala to wnioskować, że w grupie osób z depresją, im wyższy jest poziom ekspresji genu ESR2 na poziomie mRNA, tym lepsze rezultaty w testach oceniających funkcjonowanie poznawcze. Przeprowadzone badanie własne w tej grupie wiekowej nie wykazało istotnych statystycznie różnic pod względem ekspresji genów ESR1 i ESR2.

Analizując funkcjonowanie poznawcze w tej grupie wiekowej, u zdrowych kobiet zaobserwowano bardzo silną korelację między ekspresją ESR2 (mRNA) a wynikiem testu Łurii wykonanym po 30 minutach, co ponownie potwierdzałoby związek tego genu z procesami pamięci i uczenia się. Kolejne wyniki, które uzyskała Doktorantka dotyczą kobiet i wskazują, że pośród wszystkich kobiet ekspresja ESR2 (mRNA) zależała pozytywnie słabo od wieku, natomiast w grupie kobiet z depresją korelacja ta okazała się być silniejsza-umiarkowana. Wyniki dotyczące zmiennych klinicznych i socjodemograficznych okazały się być istotne. Doktorantka wykazała, że ekspresja ESR1 (mRNA) może wpływać na czas trwania depresji, im wyższy poziom ekspresji tym dłuższy czas trwania choroby. Poza tym płeć i wiek okazały się być predyktorami depresji. Interesujące wyniki dotyczą porównania różnic między wykształceniem średnim a wyższym a wynikami testów poznawczych w obu grupach badanych. Wśród osób z depresją odnotowano więcej istotnych statystycznie różnic we wszystkich skalach: we wszystkich testach Łurii (test po 30 minutach - różnica na poziomie tendencji statystycznej) i większą fluencję słowną oraz niższe wyniki w TMT A i B i w testach Stroopa A i B. Hipoteza dotycząca różnic w zakresie ekspresji badanych genów w zależności od płci nie potwierdziła się. Doktorantka nie odnotowała istotnej statystycznie różnicy ekspresji ESR1 i ESR2 zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Analizując różnice efektywności funkcji poznawczych u kobiet i mężczyzn, wykazała natomiast, że w grupie osób zdrowych mężczyźni mieli wyższy od kobiet poziom fluencji słownej I - litera „K” i wyższy na poziomie tendencji statystycznej poziom fluencji II - „zwierzęta”. Doktorantka potwierdziła w swoich badaniach hipotezę badawczą, że osoby chore na depresję ujawniają deficyty poznawcze, co zgodnie wykazały wszystkie przeprowadzone testy.

W ocenie Recenzenta na uwagę zasługuje doskonałe referowanie wyników badań, wnikliwa analiza statystyczna zgromadzonych danych empirycznych. 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.

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 badań Doktorantka sformułowała następujące wnioski:

1. Osoby chorujące na depresję cechowały się wyższym poziomem ekspresji ESR1 zarówno na poziomie mRNA jak i białka.
2. Ekspresja genów ESR1 i ESR2 jest istotnie związana z funkcjonowaniem w badanych obszarach poznawczych.
3. Istnieje związek między ekspresją genu ESR1 na poziomie mRNA a czasem trwania depresji.
4. Ekspresja genów ESR1 i ESR2 nie różni się istotnie statystycznie pod względem płci.
5. Ekspresja genów ESR1 i ESR2 nie różniła się istotnie statystycznie między grupą zdrowych i chorych na depresję kobiet w wieku okołomenopauzalnym

Jako Recenzent pragnę podkreślić, iż Doktorantka dokonała krytycznej analizy swoich badań, dowodząc świadomości ich ograniczeń. Kolejność rozdziałów jest poprawna. 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 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 i adekwatnych metod analizy statystycznej, co zostało zaprezentowane w rozprawie doktorskiej.

**Podsumowując**, rozprawa doktorska lek. med. Marii Kozłowiec pt. „, *Znaczenie ekspresji genów kodujących receptory estrogenowe: ESR1 i ESR2 w zaburzeniach 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 problemu naukowego oraz dowodzi ogólnej wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki medycyny i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, dlatego mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie lek. med. Marii Kozłowiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Institut Pięlegniarstwa i Położnictwa WNZ UJ CM  
Zakład Psychologii Zdrowia

prof. dr   
Kierownik Zakładu