

Wzrost 27.08.15
M. Rodziewicz-Olech

Prof. dr hab. n. med. Halina Batura-Gabryel
Kierownik Katedry i Kliniki Pulmonologii,
Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Poznań, 30. 07. 2015 r.

RECENZJA ROZPRAWY

na stopień doktora nauk medycznych

lekarza medycyny Krzysztofa Gomułki

Polimorfizm genu VEGF a nieodwracalna bronchoobturacja u chorych na astmę oskrzelową

Przygotowana pod kierunkiem Prof. dr hab. n. med. Jerzego Liebharda

W Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Geriatrii i Alergologii z Wydziału Lekarskiego

Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Astma to jedna z najczęściej występujących przewlekłych chorób układu oddechowego, która generuje znaczne koszty społeczne i ekonomiczne. W zmiennej historii naturalnej tej choroby dochodzi do okresów zaostrzeń i remisji indywidualnie u poszczególnych chorych. Charakterystyczną cechą astmy jest występowanie w drogach oddechowych reakcji zapalnej z udziałem komórek zapalnych oraz z produkcją i wydzielaniem mediatorów stanu zapalnego. Proces ten prowadzi do swoistej przebudowy ściany dróg oddechowych oraz do objawów klinicznych choroby z tym związanych. U części chorych dochodzi do nieodwracalnej obturacji dróg oddechowych i do odpowiadających temu zjawisku objawów klinicznych. Patogeneza powstawania nieodwracalnej obturacji oraz czynniki sprzyjające temu procesowi u chorych z astmą nie są szczegółowo określone.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma postać wydruku komputerowego. Układ pracy klasyczny, konstrukcja prosta, a poszczególne jej części pozostają we właściwych do siebie proporcjach. Rozdziały główne zakończono wnioskami i streszczeniem w języku polskim i angielskim. Umieszczono również spis tabeli i rycin oraz wykaz skrótów. Rozprawę zilustrowano 24 tabelami i 17 rycinami. Należy zwrócić uwagę na staranne opracowanie tabel i rycin z danymi z badań własnych. W spisie piśmiennictwa znajdują się 202 pozycje, głównie w języku angielskim, wykorzystane prawidłowo w tekście pracy. Rozprawa napisana jest poprawnym, zrozumiałym językiem, a tabele i ryciny przyczyniają się do łatwiejszego zrozumienia jej treści.

We wstępie Doktorant dokonał wnikliwego przeglądu aktualnego piśmiennictwa dotyczącego tematu rozprawy. W nowoczesny i zwięzły sposób zamieścił dane dotyczące definicji i specyficznych cech klinicznych astmy. Opisał również komórki uczestniczące w alergicznym procesie zapalnym

(bazofile, eozynofile i granulocyty) oraz ich udział w tym charakterystycznym dla astmy zapaleniu. W rozdziale 2 w sposób przejrzysty przedstawił aktualne poglądy na istotę prowadzenia badań genetycznych w astmie, a w rozdziale 3 geny związane z podatnością na astmę i aspekty dotyczące związków interakcji gen-środowisko. Rozdziały 4 i 5 dotyczą czynnika wzrostu naczyniowego (budowy i funkcji VEGF, roli w patogenezie astmy i w remodelingu płuc, potencjalne możliwości terapeutyczne związane z tym czynnikiem oraz polimorfizmy VEGF). Wskazał również na niewyjaśnione elementy dotyczące udziału VEGF w tych procesach. U części chorych na astmę może dochodzić do nieodwracalnego zwężenia dróg oddechowych (obturacyjnej obturacji oddechowej). Stopień zaawansowania i szybkość rozwoju tego rodzaju zmian są indywidualnie zróżnicowane. Procesom remodelingu towarzyszy rewaskularyzacja i tworzenie nowego unaczynienia w zmienionych tkankach. Teoretycznie jest prawdopodobne, że udział w tych zjawiskach bierze VEGF. Zaobserwowano wzrost stężenia VEGF we krwi i jego korelację z liczbą nowopowstałych naczyń. Z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że to zjawisko jest uwarunkowane genetycznie. Wpływ polimorfizmu genu VEGF na przebudowę w obrębie dróg oddechowych u osób dorosłych z astmą jest jednak niedostatecznie poznany i opisany w literaturze. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę odpowiedniej Komisji Bioetycznej.

Z przesłanek przedstawionych we wstępie jasno wynika zwięźle określony **cel pracy**. Jest on bezpośrednią konsekwencją problemów poznawczych przedstawionych w założeniach badania. Celem badania było podjęcie próby identyfikacji fenotypu astmy charakteryzującego się przyśpieszoną przebudową dróg oddechowych z nieodwracalną obturacją oskrzeli oraz otwarciem drogi do wczesnego rozpoznania tego rodzaju chorych, co mogłoby doprowadzić do opracowania nowoczesnego i wielokierunkowego leczenia tej grupy chorych na astmę.

Autor przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej zrealizował cele pracy poprzez próbę wykazania asocjacji polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) w pozycji -2549 -2567 del18 w obrębie rejonu promotorowego genu dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego z rozwojem nieodwracalnego zwężenia dróg oddechowych u dorosłych chorych na astmę. Przeprowadził analizę korelacji między występowaniem polimorfizmu i nieodwracalnej obturacji dróg oddechowych z podwyższonym stężeniem VEGF we krwi i wzmożoną aktywnością komórek alergicznego zapalenia (bazofile) u badanych chorych z astmą. Podjęty temat pracy jest interesującą próbą wyjaśnienia jednego ze stosunkowo mało poznanych elementów drogi patogenetycznej potencjalnie prowadzącej u chorych na astmę do nieodwracalnego zwężenia dróg oddechowych.

W rozdziale 7 „**Materiał i metody**” autor rozprawy szczegółowo przedstawił grupę badaną i kontrolną. Do badania włączono 122 osoby. Grupa badana to 82 chorych na astmę, podzielonych na

2 części: liczącą 40 chorych z odwracalną obturacją drzewa oskrzelowego oraz 42 chorych z nieodwracalną obturacją. Pozostałe 40 osób włączonych do badania to grupa kontrolna złożona z osób zdrowych. Wszystkie grupy badanych zostały dobrane prawidłowo według zasad metodologii prowadzenia badań. W opisie grup badanych znajdujemy szczegółowe informacje dotyczące rozpoznania, czasu trwania choroby i jej przebiegu oraz klasyfikacji ciężkości w obu grupach chorych, palenia tytoniu i stosowanych leków wziewnych. W dalszej części rozdziału umieszczono wykaz materiałów i sprzętu laboratoryjnego oraz przedstawiono opis metod stosowanych w badaniach laboratoryjnych i klinicznych, w tym spirometrii z próbą rozkurczową zgodnie z obowiązującymi standardami. W trakcie badania oznaczano polimorfizm pojedynczych nukleotydów genu VEGF w pozycji -2549-2567 del 18 metodą PCR; stężenie VEGF w surowicy metodą ELISA; ekspresję antygenu CD203c na powierzchni bazofila metodą cytofluorometrii przepływowej. Do badań wykorzystano krew obwodową odpowiednio przygotowaną i zamrożoną. Metody badań wybrane zostały w sposób odpowiedni do celów pracy. Uzyskane wyniki badania poddano właściwie dobranej analizie statystycznej.

W rozdziale 8 przedstawiono **wyniki badań** zilustrowanych tabelami i rycinami, a w rozdziale 9 znajduje się syntetyczne ich podsumowanie. Na podstawie wyników autor stwierdził, że polimorfizm del18 wykazuje asocjacje w występowaniem astmy. Ponadto genotyp del18 genu VEGF jest powiązany z astmą oskrzelową z nieodwracalną obturacją. Polimorfizm genu VEGF w obrębie regionu promotorowego w pozycji -2549 -2567 del18 może mieć wpływ na ciężkość obturacji oskrzeli u dorosłych z astmą. Wyniki badania wskazują na możliwość wzmożenia efektu fenotypowego wariantu genetycznego del18 w rozwoju nieodwracalnej obturacji w astmie. Udowodnienie wpływu polimorfizmu genu VEGF w badanej pozycji na przebieg astmy jest pierwszą tego typu analizą wykonaną u dorosłych z astmą.

W kolejnym etapie badań dotyczącym analizy stężenia VEGF w surowicy krwi osób zdrowych i chorych na astmę stwierdzono istotnie wyższe stężenie VEGF u chorych na astmę z nieodwracalną obturacją oskrzeli. Ponadto wyższe stężenie VEGF wystąpiło u chorych z astmą obciążonych genotypem del18 niż z genotypem *ins*. Innym ważnym rezultatem pracy Kandydata jest wzrost aktywacji bazofilów przy udziale VEGF. Wyniki badań Doktoranta jasno wykazują korelacje między czynnikami genetycznymi a środowiskowymi w ujawnieniu się określonego fenotypu klinicznego choroby.

Po dokonaniu przedstawienia wyników pracy Doktorant przeprowadził wyczerpującą **dyskusję**, w której wykazał się głęboką znajomością tematu i najnowszego piśmiennictwa. Uzyskane przez Doktoranta wyniki zostały prawidłowo zinterpretowane i porównane z wynikami innych

autorów. **Wnioski** odpowiadają wyznaczonym celom pracy. Mają znaczenie nie tylko poznawcze, lecz także kliniczne.

Nowatorskie elementy pracy i bardzo interesujące wyniki badań Doktoranta mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia złożonej patogenezy przebudowy oskrzeli obserwowanej w astmie z nieodwracalnym zwężeniem oskrzeli. Niewątpliwie na zwrócenie uwagi zasługuje postawienie przez Autora na podstawie wyników recenzowanej rozprawy oryginalnej hipotezy dotyczącej **istnienia nowej, dotychczas nie rozważanej ścieżki tego procesu**. Hipoteza ta powinna skłaniać do przeprowadzenia dalszych badań na większych grupach chorych. Jej potwierdzenie może przyczynić się do wprowadzenia nowego sposobu leczenia chorych na astmę. Wyniki badań Doktoranta wpisują się w aktualną dyskusję dotyczącą trudności w rozpoznawaniu astmy, POChP i ACOS (zespołu nakładania astma-POChP), szczególnie u palaczy tytoniu. Prawidłowe różnicowanie chorób przebiegających z obturacją oskrzeli ma wpływ na właściwe leczenie tych chorych.

Uwagi recenzenta

1. Recenzent proponuje przerehabilitowanie części wniosków, gdyż niektóre z nich są bardziej omówieniem wyników niż wnioskiem. Dla lepszej przejrzystości proponuję ich skrócenie.
2. Uwagi redakcyjne: proponuję, by Autor wstawił do niektórych rycin wskazówkę, które z przedstawianych różnic są istotne statystycznie np. ryc. 16a, 16b, 17, co ułatwiłoby zapoznanie się z wynikami badań. Ponadto znaleziono kilka błędów literowych.

Uwagi te w żadnym razie nie pomniejszają wysokiej wartości merytorycznej rozprawy przedłożonej do oceny.

Podsumowanie recenzji

W recenzowanej rozprawie doktorskiej lekarza medycyny Krzysztofa Gomułki na uwagę zasługuje oryginalna, kompleksowa konstrukcja pracy, biorąca pod uwagę wyniki badań laboratoryjnych, w tym genetycznych w odniesieniu do danych uzyskanych w trakcie badania czynnościowego płuc u w grupach chorych na astmę z i bez nieodwracalnej obturacji. Przedstawiona do recenzji rozprawa wpisuje się do bardzo aktualnego nurtu badań naukowych, których celem jest lepsze poznanie modelu czynników mających wpływ na różnorodność przebiegu klinicznego astmy oraz ich ewentualnego zastosowania do identyfikacji fenotypów chorych. Podjęty temat pracy jest interesującą, innowacyjną próbą wyjaśnienia jednego ze stosunkowo mało poznanych elementów drogi patogenetycznej potencjalnie prowadzącej u chorych na astmę do nieodwracalnego zwężenia dróg oddechowych. Należy podkreślić, że rozprawa ma charakter nowatorski, gdyż dotychczas jest mało doniesień, które oceniałyby ewentualny wpływ polimorfizmu genu VEGF na przebudowę dróg

oddechowych u dorosłych chorych na astmę. Oryginalne podejście do problemu przejawia się również w podejmowaniu tematu dotychczas szczegółowo nieopisanego a mającego istotne implikacje praktyczne.

Przedstawioną do recenzji rozprawę na stopień doktora nauk medycznych oceniam wysoko nie tylko ze względu na koncepcję tematu i wartość merytoryczną, ale także ze względu na wynikające z niej wnioski praktyczne i interdyscyplinarny charakter. Przedstawione interesujące wyniki badań sugerują potrzebę dalszej ich kontynuacji. Rozprawa stanowi oryginalny wkład do dorobku naukowego Autora. Kandydat wykazał umiejętność prowadzenia badań w wybranej przez siebie dziedzinie wiedzy. Oceniana rozprawa lekarza medycyny Krzysztofa Gomułki jest przygotowana starannie i rzetelnie. W pełni odpowiada wymaganiom stawianym rozprawie na stopień doktora nauk medycznych.

Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lekarza medycyny Krzysztofa Gomułki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wniosuję również o wyróżnienie ocenianej rozprawy.

Halina Batura-Gabryel

Prof. dr hab. n. med. Halina Batura-Gabryel
INTERNISTA
SPECJALISTA CHOROŃ PŁUC
2760503