

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. med. Krzysztofa Gomułki pt:
„Polimorfizm genu VEGF a nieodwracalna bronchoobturacja
u chorych na astmę oskrzelową”.

Astma oskrzelowa jest przewlekłą chorobą dróg oddechowych na którą choruje obecnie na świecie ponad 300 milionów ludzi i uznaje się ją za najczęstszą przewlekłą chorobę zarówno u dzieci jak i u osób dorosłych poniżej 40 roku życia. Cechą charakterystyczną astmy jest występowanie przewlekłego procesu zapalnego w obrębie dróg oddechowych z naciekami komórek zapalnych oraz wydzielaniem mediatorów stanu zapalnego. Przewlekłe zapalenie prowadzi do nadreaktywności oskrzeli, co z kolei indukuje objawy kliniczne choroby.

Zmiany morfologiczne w układzie oddechowym, charakterystyczne dla astmy to skurcz mięśniówki gładkiej oskrzeli, obrzęk błony śluzowej z nadmierną sekrecją gęstego, lepkiego śluzu, co w miarę progresji choroby prowadzi do przebudowy strukturalnej ściany dróg oddechowych czyli remodelingu. Procesy te, jeżeli trwają długo, mogą prowadzić do utrwalenia się zmian patologicznych w obrębie drzewa oskrzelowego z ich nieodwracalnym zwężeniem.

Zgodnie z definicją astmy zaproponowanej w roku 1995 przez GINA i jej kolejne uaktualnienia do roku 2014 – 2015, astmę oskrzelową określa się jako przewlekłą chorobę zapalną dróg oddechowych, w której udział biorą liczne komórki i substancje przez nie uwalniane do mikrośrodowiska.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego – należy do ważnych mediatorów toczącego się procesu zapalnego w obrębie dróg oddechowych w przebiegu astmy oskrzelowej. Wpływ tego czynnika nie ogranicza się tylko do komórek śródbłonna naczyniowego, ale jego aktywność obejmuje inne komórki takie jak monocyty, makrofagi, leukocyty i macierzyste komórki embrionalne.

Wyniki wcześniejszych badań potwierdziły, że VEGF odgrywa istotną rolę w toczącym się procesie zapalnym w astmie. Wydzielany jest głównie przez komórki nabłonka oskrzeli i płuc, komórki mięśni gładkich naczyń, komórki śródbłonna naczyń, makrofagi, migrujące do drzewa oskrzelowego neutrofile oraz limfocyty TH₂. Czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego wywiera również



Kierownik Kliniki
prof. dr hab. n. med.
Ryszard Kurzawa

KLINIKA

ALERGOLOGII

I PNEUMOLOGII

INSTYTUTU

GRUŻLICY

I CHOROÓB PŁUC

ODDZIAŁ
TERENOWY
im. JANA I IRENY
RUDNIKÓW
W RABCE ZDRÓJU

34-700 RABKA ZDRÓJ

ul. Prof. Jana Rudnika 3b Paw II

tel. (018) 26 76 936

fax: (018) 26 79 850

e-mail:

rkurzawa@zpigichp.edu.pl

istotny wpływ na eozynofile, których rola w przebiegu chorób o podłożu alergicznym jest dobrze udokumentowana.

Gen dla VEGF zlokalizowany jest na chromosomie 6p.21.3 i składa się z regionu kodującego, złożonego z 8 eksonów, oddzielonych od siebie 7 intronami.

Ponieważ VEGF jest ważnym elementem na ścieżce przekazywania sygnału w trakcie procesu angiogenezy, region ten (16p21) cieszy się zainteresowaniem badaczy poszukujących polimorfizmów pojedynczych nukleotydów - Single nucleotide polymorphism (SNP). Ze względu na niewielką ilość prac oryginalnych dotyczących SNP genu VEGF w dorosłej populacji, podjęcie tego tematu przez doktoranta i przeprowadzenie badań związku polimorfizmu – 2549-2567 del18 dla tego regionu w grupie osób dorosłych, chorujących na astmę oskrzelową z odwracalną i nieodwracalną obturacją oskrzeli w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych, bez przewlekłych chorób układu oddechowego, uważam w pełni za zasadne i ciekawe.

MASZYNOPSIS recenzowanej pracy lek. med. Krzysztofa Gomułki składa się z 86 stron właściwego tekstu podzielonego na rozdziały: wstęp, założenie i cel pracy, materiał i metody, wyniki badań, dyskusja i wnioski.

Najistotniejsze elementy opracowania powtórzone są w 3 stronicowym streszczeniu w języku polskim i angielskim. Orientację w tekście ułatwia spis treści i użytych skrótów, jak również spis tabel i rycin. Wykaz 202 pozycji piśmiennictwa, w większości anglojęzycznego cytowanego w tekście pracy został zamieszczony na końcu opracowania.

WE WSTĘPIE autor podaje najważniejsze informacje na temat astmy oskrzelowej zwracając uwagę na definicję oraz patomechanizm choroby, opisując komórki biorące udział w alergicznym procesie zapalnym. W dalszej części wstępu autor zwraca uwagę na występowanie genetycznych uwarunkowań astmy oraz opisuje strategie badawcze poszukiwań genów, które mogą być związane z aspektem dziedziczenia choroby (analiza sprzężeń oraz analiza asocjacji). Doktorant podaje informacje, że obecnie w badaniach bazujących na analizie asocjacji genów kandydujących wykorzystywane są oznaczenia polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP), gdyż uważa się, iż zdecydowana większość aberracji genetycznych skutkujących rozwojem chorób złożonych spowodowana jest właśnie zaburzeniem tego typu.

O udowodnionym wpływie SNP na ekspresję fenotypu choroby świadczyć może w pierwszej kolejności pojawienie się mutacji, która wywołuje ewidentną zmianę w funkcji genu lub w stężeniu i funkcji produktu tego genu, następnie za pomocą analiz statystycznych prowadzonych badań asocjacji dochodzi się do możliwości biologicznego wytłumaczenia mechanizmu zmiany funkcji genu.

W końcowej części wstępu doktorant przedstawił charakterystykę czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), opisując budowę, podstawowe funkcje, komórki i cytokiny wpływające na jego syntezę i działanie, jak również rolę w patogenezie astmy oskrzelowej i w rozwoju remodelingu płuc.

CEL PRACY - przedstawiony jest jasno i jest logicznym następstwem dyskusji w piśmiennictwie przytoczonym we wstępie i uzasadnia potrzebę podjęcia tych badań.

MATERIAŁ I METODY - Materiał do badań stanowiła grupa 122 dorosłych osób (w tym 80 kobiet i 42 mężczyzn) w wieku od 20 – 70 lat podzielonych na 2 grupy.

1. 82 osobowa grupa chorych na astmę oskrzelową, która na podstawie wyników badania spirometrycznego z wykonaną próbą odwracalności obturacji oskrzeli po podaniu krótko działającego betamimetyku wg wytycznych GINA 2011 podzielona została na dwie podgrupy:

Podgrupa I A – 40 osób z odwracalną bronchoobturacją

Podgrupa I B – 42 osoby z nieodwracalną obturacją oskrzeli

2. Grupę kontrolną stanowiło 40 osób zdrowych (w tym 26 kobiet i 14 mężczyzn).

Astmę oskrzelową rozpoznano i różnicowano z POChP na podstawie wytycznych GINA – 2011 oraz GOLD 2011, a także algorytmu Liebarta i Dor. Warunkiem włączenia do grupy badanej pacjentów był wiek 18 – 70 lat oraz rozpoznanie astmy oskrzelowej, a kryterium wyłączenia: wiek poniżej 18 lat lub powyżej 70 r.ż., okres zaostrzenia astmy, zespół nakładania AO i POChP oraz współwystępowanie ciężkich chorób przewlekłych.

Do grupy kontrolnej włączono osoby w wieku 18 – 70 lat, ze stwierdzonym dobrym stanem zdrowia zgodnym z definicją WHO i brakiem przewlekłej choroby dróg oddechowych oraz chorób alergicznych.

Badania wykonywano w 3 etapach.

Początkowy etap obejmował określenie występowania polimorfizmu insercyjno-delecyjnego w obrębie regionu promotorowego genu dla VEGF w pozycji -2549 -2567 del118 za pomocą metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). W drugim etapie oznaczano stężenie VEGF w surowicy krwi za pomocą ilościowej metody immunoenzymatycznej (testu podwójnego wiązania ELISA), a w trzecim etapie, za pomocą cytometrii przepływowej analizowano aktywność bazofilów na podstawie znakowania przeciwciałem anti-CD203c w środowisku zawierającym czynnik stymulujący fMLP (kontrola pozytywna), a także VEGF we wzrastających stężeniach w próbie komórek niestymulowanych. Doktorant zamieścił w pracy doktorskiej informację, że na przeprowadzenie tych badań uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy UM we Wrocławiu Nr KB – 68/2011

Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu programu STATISTICA 10. Normalność rozkładów oceniono za pomocą testu W. Shapiro-Wilka, Dla zmiennych, które nie podlegały rozkładowi normalnemu stosowano testy nieparametryczne (statystyka opisowa, test chi-kwadrat z poprawką Yatesa i test Fishera). Dla najważniejszych zmiennych wyniki przedstawiono w formie ilorazów szans (OR) z 95% przedziałami ufności. Porównania pomiędzy grupami przeprowadzono za pomocą testu U. Manna-Whitneya, testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa, natomiast współzależność pomiędzy analizowanymi zmiennymi oceniono za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana ustalając poziom istotności statystycznej na poziomie $p < 0,05$.

WYNIKI BADAŃ I OMÓWIENIE - zostały przedstawione przez lek.med. Krzysztofa Gomułkę na 31 stronach zwartej tekstu oraz na 12 rycinach i 19 tabelach, które w sposób szczegółowy i przejrzysty pozwalają ocenić uzyskane wyniki badań.

Doktorant wykazał, że:

1. Dystrybucja genotypu -2549 -2567 del18 w obrębie rejonu promotorowego genu czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) u dorosłych chorych na astmę oskrzelową różni się istotnie od obserwowanej w grupie kontrolnej. Szansa wystąpienia genotypu del18 (vs ins) jest istotnie wyższa u chorych na astmę oskrzelową niż

w populacji ogólnej, co jest szczególnie silnie wyrażone w przypadku chorych z nieodwracalną bronchoobturacją.

2. Uzyskane wyniki badań potwierdziły, że wpływ palenia papierosów sprzyja rozwojowi nieodwracalnej bronchoobturacji u chorych na astmę, jakkolwiek nie można jednak tego nałogu uznać za czynnik bezwzględnie dominujący, ponieważ większość astmatyków, u których stwierdzono nieodwracalną bronchoobturację, nigdy papierosów nie paliła.
3. Osoczowe stężenie VEGF było podwyższone w grupie pacjentów z astmą oskrzelową, zwłaszcza u astmatyków z nieodwracalnym zwężeniem dróg oddechowych.
4. Obecność genotypu -2549 -2567 del 18 genu VEGF była skojarzona ze zwiększonym stężeniem VEGF w surowicy zarówno u chorych na astmę oskrzelową, jak i w grupie kontrolnej.
5. Stymulacja bazofilów przy udziale VEGF wzmacnia średnią aktywność tych komórek, której miarą jest ekspresja cząsteczki CD203c na ich powierzchni. U pacjentów obciążonych genotypem del18 w grupie kontrolnej oraz w grupie pacjentów z astmą oskrzelową aktywność bazofilów po stymulacji VEGF była wyższa niż w próbie komórek niestymulowanych.
6. Aktywacja bazofilów pod wpływem stymulacji VEGF była wyższa u chorych z genotypem del18 niż u pacjentów z genotypem ins.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na pojedyncze błędy stylistyczne oraz edycyjne błędy komputerowe powstałe w czasie przepisywania pracy, które nie zmniejszają mojej bardzo pozytywnej oceny przedstawionej mi do recenzji pracy.

Uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. med. Krzysztofa Gomułki dowodzi odpowiedniego poziomu wiedzy teoretycznej oraz właściwego przygotowania do prowadzenia badań. Godnym podkreślenia jest fakt, że uzyskane przez Doktoranta wyniki badań dyskutowane i omawiane w tej rozprawie, układają się w logiczny ciąg, który wskazuje na kolejną, dotychczas nie braną pod uwagę ścieżkę, prowadzącą do przebudowy oskrzeli w astmie, a mianowicie, że polimorfizm regionu promotorowego -2549 -2567 genu VEGF w postaci obecności genotypu del 18, na co właśnie zwrócił uwagę Doktorant, nie tylko jest skojarzony z podwyższonym stężeniem VEGF w surowicy krwi, ale także, że zwiększona pod wpływem tego czynnika aktywacja bazofilów zwiększa

predyspozycję do uwalniania mediatorów z tych komórek, co może sprzyjać rozwojowi remodelingu. Myślę, że warto byłoby tę hipotezę potwierdzić w dalszych badaniach na większej grupie pacjentów z astmą.

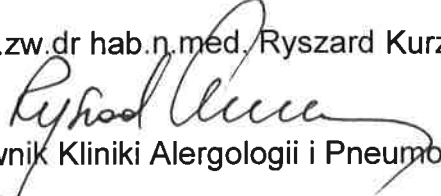
Przechodząc do podsumowania jestem zdania, że:

1. Doktorant jasno określił zagadnienie badawcze które stanowi przedmiot rozprawy doktorskiej.
2. Samodzielnie rozwiązał przedstawiony problem, przy pomocy odpowiednio zaplanowanych i przeprowadzonych badań.
3. Wykazał się dobro orientacją w przedmiocie opracowania i dowiódł umiejętności samodzielnego posługiwania się metodami naukowymi w czasie analizy i porównywania wyników badań.
4. Wyciągnął wnioski adekwatne do poczynionych spostrzeżeń.

Stwierdzam więc, że rozprawa doktorska lek. med. Krzysztofa Gomułki pt. „Polimorfizm genu VEGF a nieodwracalna bronchoobturacja u chorych na astmę oskrzelową” odpowiada kryteriom, jakie powinna spełniać praca doktorska zgodnie „z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65 poz. 595, z późn. zm.)”, dlatego z pełnym przekonaniem, przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek, o wyróżnienie tej rozprawy i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rabka Zdrój, 2015-08-04

Prof.zw.dr hab.n.med. Ryszard Kurzawa


Kierownik Kliniki Alergologii i Pneumonologii
OT IGiChP w Rabce Zdroju