



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

## Ocena

### Rozprawy doktorskiej mgr biologii Iwony Gilowskiej pt. „Ocena roli polimorfizmów genów kodujących metaloproteazę i ich tkankowe inhibitory w patogenezie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc”

Metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) degradują białkowe składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). W warunkach fizjologicznych, aktywność MMP jest regulowana na poziomie transkrypcji, aktywacji prekursorowych zymogenów proMMP i oddziaływań z endogennymi inhibitorami (TIMP, tkankowe inhibitory metaloproteaz). Zaburzenia równowagi w układzie MMP/TIMP wpływają na rozwój wielu chorób, między innymi nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych, neurologicznych, autoimmunologicznych. Uważa się również, że odgrywają dużą rolę w etiopatogenezie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP). Polimorfizm genetyczny genów kodujących metaloproteazę i ich tkankowe inhibitory może mieć wpływ na ryzyko zachorowania i przebieg kliniczny POChP.

Celem pracy Doktorantki było:

1. Określenie wpływu polimorfizmu SNP, CNV genów kodujących metaloproteazę 9 i 12 i ich tkankowego inhibitora 3 na podatność na POChP.
2. Zbadanie związku pomiędzy polimorfizmem SNP, CNV genów *MMP9*, *MMP12*, *TIMP3* i ekspresja białek *MMP9*, *MMP12* i *TIMP3*.
3. Wpływ polimorfizmów SNP, CNV genów kodujących *MMP9*, *MMP12* i *TIMP3* na funkcję płuc ocenianą za pomocą badania spirometrycznego ( $FEV_1$ ,  $FEV_1\%FVC$ ).
4. Określenie stężenia białek *MMP9*, *MMP12*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* oraz kompleksów *MMP9/TIMP1* i *MMP9/TIMP2* w surowicy pacjentów z POChP oraz u osób z grupy kontrolnej.
5. Określenie polimorfizmów SNP, CNV wśród kobiet i mężczyzn w poszczególnych grupach badawczych oraz ich wpływu na stężenie białek *MMP9*, *MMP12*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* oraz kompleksów białkowych *MMP9/TIMP1* i *MMP9/TIMP2*.

Praca ta posiada prawidłowy układ i struktury podziału treści.

Wstęp rozprawy doktorskiej jest obszerny i zawiera szereg podrozdziałów.

Doktorantka kolejno omawia anatomię i fizjologię mięszu płuc, funkcję płuc, historię badań nad przewlekłą obturacyjną chorobą płuc, jej epidemiologię, czynniki ryzyka środowiskowe i genetyczne, patogenezę choroby, diagnostykę, czynniki ryzyka zaostrzeń choroby, etapy rozwoju. Osobny rozdział poświęcony jest diagnostyce różnicowej, najczęściej występującym chorobom współistniejącym oraz terapii.

Kolejny obszerny podrozdział poświęcony jest klasyfikacji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowych oraz ich tkankowym inhibitorom. Omawia dokładnie budowę i strukturę metaloproteinaz, regulację ich ekspresji i aktywności oraz funkcji. Następnie kolejno omawia charakterystykę i funkcję metaloproteinaz 9 i 12. Następnie rozdział poświęcony jest charakterystyce inhibitorów metaloproteinaz i mechanizmów hamowania aktywności metaloproteinaz przez ich inhibitory.

Wstęp stanowi dobre i w pełni wyczerpujące wprowadzenie do badań własnych. Założenia i cel pracy ujęto w sposób jasny.

Badania przeprowadzono u 335 osób chorych na POChP i 309 osób stanowiących grupę kontrolną.

Genotypowanie polimorfizmów genów dla metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów przeprowadzono z wykorzystaniem metod PCR-RFLP i PCR z wykorzystaniem sond molekularnych typu TaqMan. Na każdym etapie poddawano analizie zarówno próbki badane jak również próbkę niezawierającą DNA, która stanowiła kontrolę ujemną.

Ocenę liczby kopii genów (CNV) kodujących metaloproteinazy, jak również ich tkankowe inhibitory przeprowadzono przy zastosowaniu łańcuchowej reakcji PCR z wykorzystaniem komercyjnego zestawu sond typu TaqMan, Applied System.

Stężenie białek i ich kompleksów białkowych mierzono w surowicy krwi obwodowej przy pomocy testów immunoenzymatycznych. U każdej osoby z grupy badanej i kontrolnej przeprowadzono badanie spirometryczne.

Metody badawcze są adekwatne do przeprowadzenia zaplanowanych badań. Wszystkie metody zostały opisane bardzo szczegółowo. Cały dział obrazuje ogrom pracy, który Doktorantka musiała włożyć podczas wykonywania swoich badań oraz wskazuje na bardzo wysoki poziom warsztatu badawczego, w którym ta praca została wykonana.

Wyniki rozprawy zostały opracowane starannie i jasno przedstawione w postaci tabelarycznej oraz na rycinach. Doktorantka stwierdziła, że wyniki badań dotyczące polimorfizmu -1562C/T genu *MMP9* (rs3918242) nie wykazały istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genotypów jak i alleli pomiędzy opisywanymi grupami. Analiza polimorfizmów -82A/G *MMP12* (rs2276109) wykazała istotną statystycznie różnicę występowania allela A u chorych na POChP w pozycji -82 ( $p=0,029$  badana vs kontrolna;  $p=0,0005$  badana vs kontrolna palących;  $p=0,01$  kontrolna palących vs kontrolna niepalących). Wyniki te sugerują, że polimorfizm -82A/G genu *MMP12* może być czynnikiem genetycznym zwiększającym ryzyko zachorowania na POChP w populacji polskiej. Ponadto wykazano, że allel G w pozycji -82 *MMP12* może pełnić funkcję ochronną.

Ocena wpływu polimorfizmu -1296T/C genu *TIMP3* (rs9619311) jako czynnika ryzyka zachorowania na POChP wykazała, że w grupie chorych allel T występuje u 53,8% chorych, natomiast w grupie kontrolnej palących u 67,7% osób; analiza częstości występowania alleli C i T wykazała znamienne statystycznie różnice częstości występowania allela T ( $p=0,0003$ ). Analiza częstości występowania genotypów *TIMP3* wykazała, że 43% genotypów występujących w grupie badanej stanowią heterozygoty CT, natomiast w grupie kontrolnej palących najczęściej występującym genotypem jest homozygota T. Różnice częstości występowania genotypów w tym genie między opisanymi grupami kształtowały się na poziomie istotności statystycznej ( $p=0,002$ ).

Analizie poddano również polimorfizmy typu CNV genów *MMP9*, *MMP12* i *TIMP3*, gdzie wykazano istnienie tendencji wskazującej na związek liczby kopii genów ze stężeniem białek *MMP9* i *TIMP3*. Jednakże ze względu na niewielką liczebność grup uwzględniających liczbę kopii genów, wyniki te mają charakter pilotażowy i wymagają dalszych badań.

Wykazano, że średnie stężenia białek *MMP9* i *MMP12* w surowicy są wyższe w grupie chorych na POChP niż w grupach kontrolnych (odpowiednio sześć- i dwukrotnie, różnice te są istotne statystycznie). W tej samej grupie zaobserwowano także najwyższe stężenia białka *TIMP1* spośród analizowanych grup. Z kolei stężenie białek *TIMP2* i *TIMP3* są najwyższe w grupie kontrolnej palących. Dlatego też z powodu braku jednoznacznego kierunku zmian stężenia tkankowych inhibitorów w surowicy osób należących do grupy chorych na POChP wydaje się być zasadną oceną stosunku molowego *MMP* i *TIMP*, aby analiza przyczyn braku równowagi pomiędzy tymi związkami była kompleksowa i poprzez to umożliwiała wdrożenie skutecznej terapii.

Przy zastosowaniu modeli regresji wielorakiej grzbietowej wykazano istnienie ujemnej korelacji pomiędzy stężeniem białek MMP9 i MMP12 a wartością FEV<sub>1</sub> i FEV<sub>1</sub>/FVC. W odniesieniu do stężenia białka TIMP3 wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy stężeniem tego białka a wartościami wskaźników FEV<sub>1</sub> i FEV<sub>1</sub>/FVC.

Przeprowadzono również analizy wewnątrzgrupowe z uwzględnieniem podziału na płeć, których wyniki nie wykazały istnienia istotnych statystycznie różnic w częstości występowania analizowanych w pracy genotypów *MMP9*, *MMP12* i *TIMP3*. Nie wykryto również różnic między płciami w wartościach stężeń ocenianych białek oraz wartościach wskaźników FEV<sub>1</sub> i FEV<sub>1</sub>%/FVC.

Podsumowując wyniki badań niniejszej pracy sugerują istnienie związku pomiędzy polimorfizmami -82A/G *MMP12* i -1296T/C *TIMP3* a ryzykiem zachorowania na POChP w populacji polskiej. Autorka sugeruje, że dalsze analizy polimorfizmów genów mogą przyczynić się do wyłonienia osób szczególnie predysponowanych do zachorowania na POChP oraz wdrożenia wczesnej profilaktyki.

Zakres wykonanych badań znacznie przekracza wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

W Dyskusji Autorka wykazała, że jest świetnie obeznana z piśmiennictwem, które jest aktualne i starannie dobrane. Z obowiązku recenzenta pragnę zaznaczyć, że kilka pozycji piśmiennictwa jest niewłaściwie cytowane (co zaznaczyłam w tekście rozprawy). Co godne podkreślenia, potrafi interpretować własne wyniki w świetle innych doniesień. Dyskusja jest obszerna i wyczerpująca. Całość rozprawy kończy się wnioskami, które są jednocześnie podsumowaniem wyników badań i znajdują odzwierciedlenie w przeprowadzonych badaniach własnych. Proponuję skorygować wniosek nr 3 i ograniczyć go do stwierdzenia, że obecność genotypu TT i allela T jest związana z ryzykiem zachorowania na POChP. Wniosek 4, który wg recenzenta powinien brzmieć „wykazano ujemną korelację między stężeniem w surowicy białek MMP9 i MMP12, natomiast dodatnią korelację między stężeniem w surowicy białka TIMP3, a badanymi parametrami funkcji płuc”.

Reasumując uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Iwony Gilowskiej ma charakter poznawczy i implikacje kliniczne. Uzyskane wyniki mają oryginalny charakter i stanowią podstawę do dalszych badań laboratoryjnych i klinicznych. Autorka wykazała szeroką wiedzę teoretyczną i opanowanie szeregu nowoczesnych technik laboratoryjnych.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wysoce pozytywną recenzję pracy z wnioskiem o dopuszczenie mgr Iwony Gilowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 16 maja 2018 r.

prof. dr hab. Irena Frydecka  
specj. chorób wewnętrznych  
i dermatologii  
51-602 Wrocław, ul. Kochanowskiego 3  
tel. 661317832 8621490