

Prof. dr hab. med. Grażyna Bochenek  
II Katedra Chorób Wewnętrznych im. Prof. Andrzeja Szczeklika  
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński  
ul. Skawińska 8  
31-066 Kraków

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Iwony Gilowskiej  
pt. „Ocena roli polimorfizmów genów kodujących metaloproteinazy i ich tkankowe  
inhibitory w patogenezie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc”**

Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) jest najczęściej występującą przewlekłą chorobą dróg oddechowych, stanowiąc poważny problem zdrowotny i społeczny. Zachorowanie na POChP jest wynikiem współdziałania predyspozycji osobniczych i czynników środowiskowych. Najlepiej poznaną przyczyną tej choroby jest palenie tytoniu. Spośród innych czynników należy wymienić narażenie na pyły i gazy w miejscu pracy, narażenia na zanieczyszczenia powietrza w pomieszczeniach zamkniętych wskutek spalania biomasy, czy też zanieczyszczenia komunikacyjne. Istotną rolę mogą odgrywać również czynniki genetyczne, a wśród nich mutacje różnych genów kodujących syntezę białek z grupy proteaz i antyproteaz. Zachowanie prawidłowej równowagi pomiędzy tymi dwiema grupami białek warunkuje prawidłową strukturę tkanki płucnej, zaś jej zaburzenie prowadzi do zmian patomorfologicznych typowych dla POChP. Fakt, że tylko około 25% przewlekłych palaczy zapada w ciągu życia na tę chorobę może sugerować komponentę genetyczną. Jednak wpływ polimorfizmów pojedynczych genów na zachorowanie na POChP nie jest ostatecznie ustalony.

Magister biologii Iwona Gilowska w przedłożonej mi do recenzji rozprawie doktorskiej podjęła cenne wyzwanie i postanowiła dokonać analizy związku pomiędzy polimorfizmami typu SNP (pojedynczego nukleotydu) oraz CNV (liczby kopii genów) w genach kodujących metaloproteinazę 9 (*MMP9*), metaloproteinazę 12 (*MMP12*) oraz tkankowy inhibitor metaloproteinazy 3 (*TIMP3*) a występowaniem POChP. W świetle aktualnej wiedzy podjęta problematyka badawcza jest trafna i oryginalna.

Tekst rozprawy liczy 164 strony. Jej układ jest poprawny z zachowaniem struktury typowej dla rozprawy doktorskiej. Wyniki przedstawiono w sposób staranny, szczegółowy i czytelny. Poza dokładnym opisaniem, zostały one zebrane w 42 tabelach i przedstawione na 21

rycinach. Bibliografia zawiera 235 pozycji piśmiennictwa ściśle związanych z tematyką pracy.

Wstęp składa się z dwóch części, z czego pierwsza omawia zagadnienia dotyczące POChP, zaś druga dotyczy metaloproteinaz i ich inhibitorów tkankowych. Doktorantka szczegółowo i precyzyjnie przedstawiła patogenezę, epidemiologię, czynniki ryzyka i diagnostykę POChP, kładąc szczególny nacisk na mechanizmy komórkowe, molekularne i genetyczne odgrywające rolę w jej rozwoju. Uzasadnia w ten sposób potrzebę prowadzenia badań nad patogenezą POChP, jakich podjęła się w swojej pracy doktorskiej. W drugiej części wstępu Doktorantka przedstawia klasyfikację metaloproteinaz macierzy i ich tkankowych inhibitorów, budowę, regulację ekspresji i aktywności metaloproteinaz, a także ich funkcje biologiczne. Choć wstęp wydaje się być zbyt obszerny, bo liczy 40 stron, to jednak czyta się go z zainteresowaniem, ponieważ dostarcza dużą dawkę aktualnej, usystematyzowanej wiedzy z zakresu omawianych zagadnień i jest napisany w sposób bardzo przystępny, poprawny językowo, stylistycznie i interpunkcyjnie. Poprawność językowa dotyczy też pozostałej części rozprawy.

Założenia badawcze zostały sformułowane poprawnie. Cele pracy Doktorantka ujęła w jednym celu głównym i pięciu celach szczegółowych.

Badanie zostało przeprowadzone w grupie 335 chorych z rozpoznaniem POChP oraz w grupie 309 osób stanowiących grupę kontrolną, którą podzielono na dwie podgrupy: palących i niepalących. POChP rozpoznawano na podstawie wywiadu i badania spirometrycznego. W poszczególnych analizach porównywano grupę chorych na POChP z grupą kontrolną w całości oraz z każdą dwóch podgrup z osobna. Ponadto w każdej grupie dokonywano porównań pomiędzy mężczyznami i kobietami. Materiałem do badań był ludzki genomowy kwas DNA wyizolowany z komórek krwi obwodowej oraz surowica. Doktorantka wymienia również jako materiał indukowaną plwocinę, ale chyba wkradł się błąd edytorski, bo w dalszej części nigdzie nie pojawiają się wyniki uzyskane z tego materiału biologicznego. Genotypowanie polimorfizmów genów dla metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów, jak również ocenę liczby kopii genów kodujących metaloproteinazy i ich tkankowe inhibitory przeprowadzono metodami PCR z wykorzystaniem sond molekularnych typu TaqMan. Stężenie białek i ich kompleksów w surowicy krwi mierzono przy pomocy testów immunoenzymatycznych typu ELISA.

Zastosowane laboratoryjne metody i narzędzia badawcze zostały dobrane i wykorzystane prawidłowo. Doktorantka przedstawiła je w sposób niezmiernie szczegółowy, wręcz perfekcyjny, z uwzględnieniem odczynników, sprzętu jednorazowego użytku, aparatury oraz dokładnie, krok po kroku opisała każdą z metod.

W przeprowadzonych badaniach Doktorantka wykazała, że polimorfizm -1562C/T genu *MMP9* (rs3918242) nie wykazał istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genotypów i alleli pomiędzy badanymi grupami. Natomiast analiza polimorfizmu -82A/G genu *MMP12* (rs2276109) wykazała istotne statystycznie różnicę występowania alleli A i G u chorych na POChP względem grupy kontrolnej sugerujące, że polimorfizm tego genu może być czynnikiem zarówno zwiększającym (występowanie allela A), jak i ochronnym dla występowania POChP. Analiza wpływu polimorfizmu -1296T/C genu *TIMP3* (rs9619311) wykazała znamienne statystycznie różnice częstości występowania allela T sugerujące jego funkcje ochronne. Analiza polimorfizmów typu CNV genów *MMP9*, *MMP12* i *TIMP3* wykazała tendencje wskazujące na związek liczby kopii genów ze stężeniem białek MMP9 i TIMP3, jednakże ze względu na niewielką liczebność grup wyniki należy traktować jako pilotażowe i konieczne są dalsze badania. Z kolei badanie stężenia białek w surowicy krwi wykazało wyższe stężenia MMP9, MMP12 w grupie chorych na POChP niż w grupach kontrolnych. Natomiast porównania dotyczące stężenia inhibitorów proteinaz wykazały brak jednoznacznego kierunku zmian. Na tej podstawie wysunięto sugestie, że nie tyle samo stężenie tych białek, ile ich wzajemny stosunek molowy ma decydujące znaczenie w działaniu tych enzymów na tkankę płucną. Badanie zależności pomiędzy stężeniami badanych białek a parametrami czynności płuc wykazały ujemne korelacje pomiędzy stężeniem MMP9 i MMP12 a wartością FEV<sub>1</sub> i FEV<sub>1</sub>/FVC, zaś w przypadku stężenia TIMP3 korelacje te były dodatnie. Analizy wewnątrzgrupowe pomiędzy kobietami i mężczyznami nie wykazały istotnych różnic w częstości występowania genotypów *MMP9*, *MMP12*, *TIMP3*, jak również w wartościach stężeń ocenianych białek oraz wartościach wskaźników spirometrycznych. W ogólnym podsumowaniu wyniki niniejszej rozprawy sugerują związek pomiędzy polimorfizmami -82A/G *MMP12* i -1296T/C *TIMP3* a ryzykiem zachorowania na POChP w populacji polskiej, przy braku takiego związku co do polimorfizmu -1562C/T *MMP9*.

Dyskusja prowadzona jest w sposób dojrzały i profesjonalny. Doktorantka szczegółowo omawia i stara się rzeczowo interpretować uzyskane wyniki, a także odnosi je do wyników pochodzących z badań innych autorów. Zachowuje przy tym należyłą dozę obiektywizmu i

krytycyzmu względem uzyskanych przez siebie wyników, wskazując na potencjalne przyczyny trudności w ich interpretacji.

Całość pracy podsumowuje 7 jasno sformułowanych wniosków, które świadczą o pełnej realizacji postawionych na początku celów badawczych.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wnoszą istotną, niezwykle cenną wiedzę w tak obszernej i mało jeszcze poznanej dziedzinie, jaką jest podłoże genetyczne POChP. Mają one niewątpliwie znaczenie zarówno naukowe jak i praktyczne wpisując się w kanony medycyny translacyjnej i dając nadzieję na spersonalizowaną terapię POChP w przyszłości.

Jedyną zastrzeżenie budzi sposób posługiwania się przez Doktorantkę piśmiennictwem. Pomimo iż Doktorantka zgromadziła 235 pozycje związanego z tematem piśmiennictwa, to jednak wykorzystanie tych źródeł w wielu przypadkach nie jest poprawne. W sytuacjach, kiedy zdanie zawiera szczegółową informację, wręcz z cytowaniem danych liczbowych, wystarczy zacytować konkretną pozycję piśmiennictwa, z której te dane pochodzą. Natomiast zdarza się, że Doktorantka cytuje kilka prac, z których żadna tak naprawdę tą pracą źródłową nie jest. Dla przykładu przytoczę przykłady dwóch zdań ze Wstępu (str. 19): „W ramach tego projektu przeprowadzono również badanie w Polsce (w gminie Chrzanów i Proszowice) i wykazano, że POChP dotyczy 27,7% mężczyzn i 16,6% kobiet [67,191,192].” Żadna z trzech cytowanych prac nie jest bezpośrednim źródłem tych konkretnych danych, a dwie prace mają charakter poglądowy, a więc mogłyby być co najwyżej wtórnym źródłem takiej informacji. Wystarczyło zacytować pracę Niżankowskiej-Mogilnickiej E i wsp. Prevalence of COPD and Tobacco smoking in Malopolska region – results from the BOLD study in Poland. *Pol Arch Med Wewn* 2007; 117: 402-10., bo stąd pochodzą te dane liczbowe. Inny przykład: „Warto nadmienić, że badanie BOLD (przeprowadzone na terenie Austrii) wykazało tendencję wzrostową zachorowań wśród kobiet w przedziale wiekowym 40-49 lat, odsetek chorujących jest wyższy niż w analogicznej grupie wiekowej mężczyzn [45,46,58,83]”. Żadna z cytowanych pozycji nie jest źródłem tych danych, natomiast z tym zagadnieniem jest związana pozycja 182. Powyższe uwagi wynikają z obowiązku dokonania rzetelnej recenzji i są wskazówką dla Doktorantki, jak poprawnie wykorzystywać źródła danych przy pisaniu przyszłych publikacji. Moja uwagę nie umniejsza jednak wartości całej rozprawy doktorskiej.

W końcowej opinii stwierdzam, że rozprawa doktorska magister Iwony Gilowskiej zasługuje na wysoką ocenę.

Uważam, że niniejsza rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 ustęp 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.). i pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie magister biologii Iwony Gilowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, dnia 7.05. 2018 r.

  
Prof. dr hab. med. Grażyna Bochenek