

Kraków, 10.05.2016 r.

Dr hab. n. med. Agata Bałdys-Waligórska  
Katedra i Klinika Endokrynologii UJCM  
31-501 Kraków, ul. Kopernika 17

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**lek. med. Przemysław Janusz**

**Pt.: „Wpływ polimorfizmów genu receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksygenów  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) na rozwój i przebieg orbitopatii w chorobie Gravesa i Basedowa”**

Promotor: Dr hab. n. med. Jacek Daroszewski

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych lek. med. Przemysława Janusza została przedstawiona do recenzji jako oprawiony 115 stronicowy maszynopis zawierający 15 tabel, 3 ryciny, 12 wykresów i 248 pozycji piśmiennictwa ułożonych w kolejności cytowania. Praca ma typowy układ rozdziałów, są to: spis treści, wstęp, założenia i cele pracy, materiał i metodyka, wyniki, dyskusja, wnioski, indeks stosowanych skrótów i symboli, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz suplement zawierający tabele.

Orbitopatia tarczycowa (OT) występująca w przebiegu choroby Graves-Basedowa jest chorobą autoimmunologiczną tkanki łącznej oczodołu. Wewnątrzoczodołowe nacieki komórek jednojądrzastych, uwalnianie cytokin, gromadzenie hydrofilnych glikozaminoglikanów prowadzi do wystąpienia charakterystycznych objawów klinicznych choroby takich jak obrzęk tkanek miękkich, wytrzeszcz, uszkodzenie mięśni okoruchowych, diplopia czy uszkodzenie nerwu wzrokowego w ciężkiej postaci choroby.

W patogenezie choroby Graves-Basedowa (MGB) i orbitopatii naciekowej biorą udział czynniki genetyczne i środowiskowe.

Region HLA-DR3 głównego układu zgodności tkankowej (MHC- major histocompatibility complex) zawiera wiele genów odpowiedzialnych za odpowiedź immunologiczną i jest związany z wieloma chorobami autoimmunologicznymi. Około połowa pacjentów z MGB posiada allel DR3. Wykazano związek DR3 z ryzykiem nawrotu choroby i wystąpienia orbitopatii.

Innym z genów związanych ściśle z wieloma chorobami autoimmunologicznymi jest gen kodujący CD40, genotyp CC tego genu szczególnie predysponuje do rozwoju MGB.

Udowodniono także, że polimorfizm satelitarny zlokalizowany w regionie 3' niepodlegającym translacji genu CTLA-4 związany jest z podatnością na chorobę MGB. Zlokalizowano kilka SNP (single nucleotide polymorphism) genu TSH-R i genu tyreoglobuliny, które mogą mieć związek z MGB.

Uważa się, że również czynniki środowiskowe, takie jak zwiększona podaż jodu, zakażenia bakteryjne i wirusowe, podwyższone stężenie p-ciał p-tarczycowych, niektóre leki stosowane w HIV, czy interfeferon  $\alpha$ , mają znaczenie w patogenezie tej choroby.

Większość ekspertów akceptuje pogląd, że orbitopatia jest konsekwencją toczącego się procesu autoimmunologicznego. Czynnikiem ryzyka zachorowania na orbitopatię jest płeć żeńska i rasa azjatycka, a zwiększone występowanie rodzinne OT potwierdza rolę czynników genetycznych w patogenezie choroby. Wykryto wiele SNPs w genach mogących predysponować do orbitopatii, takich jak gen IL-1, intron genu TSH-R, gen ARID5B w locus 10q czy NRXN3 w locus 14q.

Poza czynnikami genetycznymi bada się również wpływ czynników epigenetycznych i środowiskowych na rozwój i przebieg OT. Podobnie jak w MGB jednym z czynników środowiskowych mogą być infekcje. Duża ilość pacjentów z MGB z obecnymi przeciwciałami przeciwko *Yersinia enterocolica* świadczy o pobudzeniu układu immunologicznego przez tą bakterię. Wykazano, że białka błony zewnętrznej *Y. enterocolica* reagują krzyżowo z domeną TSH-R. Istotnym czynnikiem środowiskowym mającym wpływ na rozwój OT jest palenie papierosów. Palenie papierosów zwiększa ryzyko wystąpienia wytrzeszczu i diplopii u pacjentów z MGB, zwiększa ryzyko wystąpienia i pogorszenia przebiegu orbitopatii w porównaniu z niepalącymi pacjentami, aczkolwiek nie znamy czynników odpowiedzialnych za to zjawisko.

Dane w piśmiennictwie na temat patomechanizmów prowadzących do rozwoju orbitopatii są obszerne i dotyczą wielu aspektów tej autoimmunologicznej choroby, ale też wyniki wielu prac są niejednoznaczne lub sprzeczne i wymagają dalszych badań. Lek. med. Przemysław Janusz podjął aktualny i interesujący pod względem naukowym i praktycznym temat badawczy. Autor zbadał wpływ wybranych polimorfizmów genu receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) na rozwój i przebieg orbitopatii w chorobie Gravesa-Basedowa.

## Wstęp

W obszernym i dobrze udokumentowanym przeglądzie piśmiennictwa wstępie, Autor pracy opisał:

1. znaczenie receptora dla TSH w rozwoju orbitopatii tarczycowej
2. rolę limfocytów T i B oraz cytokin w patogenezie orbitopatii
3. rolę fibroblastów oczodołowych i udział fibrocytów CD34+ w rozwoju orbitopatii tarczycowej
4. adipogenezę i remodeling tkankowy w OT
5. rolę białek tarczycy takich jak tyreoglobulina czy TSH-R w oczodole w rozwoju orbitopatii
6. udział receptora dla IGF-1
7. rolę receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) w regulacji odpowiedzi autoimmunologicznej oraz w rozwoju choroby Graves-Basedowa i orbitopatii tarczycowej
8. wpływ PPAR $\alpha$  na regulację odpowiedzi autoimmunologicznej oraz
9. udział PPAR $\alpha$  w rozwoju MGB i OT.

Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) wykazują działanie przeciwzapalne i immunomodulacyjne i jak udowodniono, mogą wpływać na rozwój chorób autoimmunologicznych, również MGB i orbitopatii tarczycowej.

**Celem rozprawy doktorskiej** była ocena wpływu trzech wybranych SNPs genu PPAR $\alpha$ : rs 135551 (c.-127+5148A>G), rs 1800206 (c.484C>G), rs 4253766(c.712-3784C>T) na obecność i nasilenie OT oraz reakcję na leczenie nadczynności tarczycy.

Cel rozprawy został sformułowany jasno i dobrze uzasadniony, a dobór tematu oceniam jako trafny.

### **Material i Metoda:**

Grupę badaną stanowiło 276 pacjentów z chorobą Graves-Basedowa hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami we Wrocławiu. Badania wykonano na 2. grupach pacjentów: z towarzyszącą OT (213 pacjentów) i bez jawnych objawów ocznych (63 pacjentów), a wyniki badania porównano z grupą kontrolną, którą stanowiły 304 zdrowe osoby.

Zakres wykonywanych badań był szeroki i obejmował:

1. ocenę kliniczną: endokrynologiczną i okulistyczną oraz
2. badania laboratoryjne:

spektrofotometryczny pomiar stężenia wyizolowanego z komórek krwi DNA,  
elektroforetyczną ocenę DNA,

oznaczanie wybranych SNPs metodą allelic discrimination oraz

analizę niezrównoważenia sprzężeń dla wybranych 3 miejsc polimorficznych.

Badania laboratoryjne wykonano w Laboratorium Immunopatologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN.

Zastosowane metody badań nie budzą wątpliwości merytorycznych.

Uzyskane wyniki zostały opracowane z użyciem nowoczesnych metod statystycznych, są wiarygodne. Zostały przedstawione w formie przejrzystych, bardzo starannie przygotowanych tabel i rycin. Sposób interpretacji wyników i wnioskowanie są właściwe.

## Wyniki

W wyniku przeprowadzonych badań autor stwierdził, że:

1. allel G i genotyp GC w miejscu polimorficznym rs1800206 występuje istotnie częściej u zdrowych kobiet w porównaniu z grupą mężczyzn, co świadczy o nierównomiernym rozkładzie alleli w tym SNP w populacji ogólnej i zachęca do prowadzenia dalszych badań z uwzględnieniem płci
2. Autor zauważył również, że allel G w tym samym miejscu rs1800206 występuje 2. krotnie częściej w grupie mężczyzn chorujących na MGB niż w grupie kobiet. I chociaż różnica nie jest istotna statystycznie Autor zauważa krytycznie, że podział grup badanych według płci spowodował, że liczba mężczyzn nosicieli tego allelu była mała, co może tłumaczyć brak istotności statystycznej.
3. analizując miejsce polimorficzne rs4253766 Autor zauważył mniejszą częstość występowania allelu T oraz genotypu CT w grupie kobiet zdrowych oraz występowanie genotypu TT jedynie w grupie kobiet chorujących na MGB, co sugeruje potencjalną rolę wariantu TT w predyspozycji kobiet do tej choroby.
4. W pracy stwierdzono znamienne statystycznie częstsze występowanie genotypu GG w miejscu rs135551 w grupie pacjentów z MGB palących papierosy. Autor zauważa, że być może oznacza to zwiększoną predyspozycję genetyczną przy synergistycznym działaniu czynnika środowiskowego jakim jest palenie papierosów, co może potwierdzać fakt występowania haplotypu GGC 4,36 ( $p=0,048$ ) razy częściej w grupie palaczy w porównaniu z pacjentami niepalącymi.
5. Analiza haplotypów badanych polimorfizmów typu SNP zlokalizowanych w genie PPAR $\alpha$  wykazała istotnie statycznie większą częstość występowania haplotypu GGC w grupie zdrowych kobiet w porównaniu do zdrowych mężczyzn.

Stwierdzam, że uzyskane w niniejszej pracy wyniki, pomimo braku znamienności statystycznej w większości badanych cech, pokazały zaznaczające się tendencje do różnej częstości występowania poszczególnych polimorfizmów w zależności od badanej cechy. Wyniki przeprowadzonych badań mogą sugerować nierównowagę w zakresie występowania wszystkich badanych SNPs w populacji ogólnej kobiet i mężczyzn, co potwierdza celowość wykonywania dalszych analiz na większych grupach, oddzielnie dla każdej płci. Wydaje się, że warto kontynuować badania z włączeniem większej liczby pacjentów- nosicieli allelu G w miejscu rs1800206.

**Dyskusja** autora z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy została przeprowadzona wnikliwie i świadczy o dużej znajomości tematu. Praca zawiera 248 pozycji piśmiennictwa w tym 41 (16%) pozycji stanowi piśmiennictwo z ostatnich 5. lat. Jest to piśmiennictwo głównie zagraniczne cytowane odpowiednio w tekście.

Przedstawiona do recenzji praca posiada dużą wartość merytoryczną, i zawiera elementy nowatorskie. Jest to pierwsza tak obszerna próba oceny roli wybranych SNPs genu PPAR $\alpha$  w wielu aspektach orbitopatii tarczycowej obejmująca dużą grupę pacjentów w piśmiennictwie polskim. Wykonanie badań do tej pracy doktorskiej wymagało dużo wysiłku, a umiejętność współpracy z Laboratorium Immunopatologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN dobrze rokuje na przyszłość.

Praca została przygotowana bardzo starannie pod względem graficznym, szczególnie bardzo staranne i czytelne są tabele zawierające wyniki badań genetycznych i opracowanie statystyczne.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na drobne uchybienia, które powinny być usunięte przed publikacją wyników badania.

Stwierdzenia takie jak „Wykazano istotnie statystycznie *różną* (tzn. jaką?) częstość występowania haplotypu GGC w grupie osób zdrowych w zależności od płci oraz nieosiągająca istotności statystycznej *odwrotną* tendencję w grupie osób chorujących na ChGB” nie przynoszą żadnej konkretnej informacji, są niezręczne i nie powinny mieć miejsca w przyszłej publikacji naukowej.

W pracy są drobne błędy literowe i ortograficzne oraz uchybienia stylistyczne, a tekst streszczenia w języku angielskim w przypadku przygotowania publikacji wymaga korekty językowej. Nie wszystkie skróty używane w tekście pracy są rozwinięte w Indeksie skrótów. Wykres 3 na stronie 39 oraz wykres 4 na stronie 40 są opisane z błędem. W legendzie tych wykresów kolor biały powinien oznaczać zdrowych pacjentów, a kolor czarny powinien oznaczać kobiety i mężczyzn z MGB.

Informacja o grupie kontrolnej powinna się znaleźć w rozdziale Materiał i Metoda.

Praca spełnia całkowicie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Oceniam ją wysoko i stawiam wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Akademii Medycznej we Wrocławiu o dopuszczenie Autora lek med. Przemysława Janusza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę do Wysokiej Rady o nagrodzenie autora recenzowanej przeze mnie pracy.

Dr hab. n. med. Agata Bałdys-Waligórska