

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
MGR FARM. DONATY DEKA-PAWLIK
PT. „ANALIZA POLIMORFIZMÓW I EKSPRESJI GENÓW
SYNTAZY METIONINY (MTR) W PATOGENEZIE STANU
PRZEDRZUCAWKOWEGO”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr farm. Donaty Deka-Pawlik podejmuje bardzo aktualny problem patogenezy stanu przedrzucawkowego (preeklampsji - PE). Od wielu lat trwają badania dotyczące przyczyn powstawania, wczesnej diagnostyki oraz profilaktyki tego jednego z najcięższych powikłań ciąży. Stan przedrzucawkowy jest jedną z postaci chorób przebiegających z nadciśnieniem tętniczym w ciąży i chociaż występuje tylko u około 2% ciężarnych, stanowi jedną z głównych przyczyn umieralności i zachorowalności okołoporodowej zarówno matek, płodów, jak i noworodków. Nasilone zmiany ogólnoustrojowe w preeklampsji mogą prowadzić do rozwoju rzucawki, w której zaburzenia w ośrodkowym układzie nerwowym ze stanem drgawkowym bezpośrednio zagrażają życiu. W wyniku kaskady procesu zapalnego i zaburzeń koagulologicznych, może również rozwinąć się zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC), a także procesy hemolizy oraz uszkodzenia komórek wątroby w postaci zespołu HELLP. Przebieg preeklampsji zależy w dużej mierze od czasu wystąpienia objawów; do celów klinicznych wyodrębnia się więc dwie postaci – wczesną i późną. W około 10% przypadków do klinicznej manifestacji zmian dochodzi przed 34 tygodniem ciąży. Prawdopodobnie wiąże się to z zaburzeniami na wczesnym etapie różnicowania i migracji trofoblastu, bowiem charakterystyczną cechą jest małe łożysko i korelacja z łożyskowymi wskaźnikami biochemicznymi w pierwszych tygodniach ciąży. W ciążach powikłanych wczesną postacią preeklampsji często również dochodzi do zahamowania wewnątrzmacicznego wzrastania płodu z objawami jego przewlekłego niedotlenienia. Kliniczny przebieg wczesnej preeklampsji u matki wiąże się z dużą dynamiką zmian ogólnoustrojowych, wymagających nierzadko pilnego przedwczesnego zakończenia ciąży. Późna postać preeklampsji rozwija się pod koniec ciąży, ma zwykle łagodniejszy przebieg i częściej dotyczy kobiet z wykladnikami zespołu metabolicznego - otyłych z nietolerancją węglowodanów, a także ciąż wielopłodowych. Wyjaśnienie etiopatogenezy nadciśnienia tętniczego w ciąży, a w szczególności jego najcięższej postaci czyli preeklampsji, stanowi przedmiot

intensywnie prowadzonych od wielu lat badań naukowych. Wydaje się, iż podłoże jest wieloczynnikowe związane raczej z obecnością łożyska niż płodu. Chociaż łożysko odgrywa decydującą rolę w rozwoju preeklampsji to jej początek, nasilenie i przebieg są uzależnione od matczynej odpowiedzi na uwalniane przez łożysko czynniki i białka. Zarówno czynniki genetyczne jak i dietetyczne i środowiskowe są przyczyną nieprawidłowego powstawania łożyska i zwiększonego uwalniania biologicznie aktywnych związków, które powodują zaburzenia w funkcji śródbłonna i nadciśnienie tętnicze u ciężarnych. Na genetyczne podłoże nadciśnienia tętniczego w ciąży wskazuje zwiększone ryzyko rozwoju preeklampsji u kobiet, których matki w przebiegu ciąży miały także to powikłanie. Analizy różnych obszarów genomu wskazują na wielogenowy charakter schorzenia. Zmiany dotyczą genów odpowiedzialnych za regulację ciśnienia tętniczego (angiotensynogenu, syntazy NO), metabolizmu lipidów i homocysteiny (APOE, LPL, MTHFR), układu krzepnięcia (czynnik V, czynnik XI, PAI-1) oraz odpowiedzi immunologicznej (TNF- α , GSTP1). Zwraca się również uwagę na geny płodu, a szczególnie zgodność w zakresie układu HLA. Zbyt duże podobieństwo genów może nie wyzwać adekwatnej odpowiedzi immunologicznej matki.

Podjęcie przez mgr farm. Donatę Dekę-Pawlik analizy polimorfizmów i ekspresji genów syntazy metioniny i reduktazy syntazy metioniny w populacji polskich ciężarnych wydaje się jak najbardziej uzasadnione.

Rozprawa doktorska mgr farm. Donaty Dekę-Pawlik ma typowy układ, składa się na nią 132 stron tekstu, 45 tabel i 25 rycin.

W liczącym 25 stron wstępie Autorka omówiła zarówno rys historyczny jak i obecnie funkcjonujące definicje i klasyfikacje chorób przebiegających z nadciśnieniem tętniczym w ciąży, a także teorie dotyczące mechanizmu powstawania i rozwoju stanu przedzucawkowego. We wstępie znalazły się również informacje na temat wczesnej diagnostyki i leczenia. Autorka przedstawiła szczegółowo udział czynników genetycznych w etiologii stanu przedzucawkowego. Wiele miejsca poświęciła przemianom homocysteiny w organizmie człowieka oraz toksycznemu wpływowi hiperhomocysteinemii.

W rozprawie doktorskiej mgr farm. Donata Dekę-Pawlik podjęła próbę oceny znaczenia polimorfizmów genów syntazy metioniny i reduktazy syntazy metioniny oraz ekspresji powyższych genów w łożysku w etiologii stanu przedzucawkowego. Aby zrealizować zasadniczy cel Doktorantka ustaliła cztery cele szczegółowe: 1.

analizę częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów 2756A>G genu syntazy metioniny (MTR) oraz 66A>G genu reduktazy syntazy metioniny (MTRR) w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym oraz zdrowych ciężarnych; 2. analizę korelacji pomiędzy badanymi polimorfizmami 2756A>G genu MTR oraz 66A>G genu MTRR a parametrami klinicznymi i biochemicznymi u kobiet ze stanem przedrzucawkowym i u zdrowych ciężarnych; 3. analizę ekspresji mRNA genu syntazy metioniny oraz genu reduktazy syntazy metioniny w łożysku kobiet ze stanem przedrzucawkowym; 4. określenie zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami genów MTR i MTRR a poziomem ich ekspresji w łożysku u kobiet ze stanem przedrzucawkowym. Zarówno cel zasadniczy, jak również cele szczegółowe zostały przez Doktorantkę jasno sformułowane i stanowiły istotne cele badawcze.

W rozdziale dotyczącym materiału i metodyki mgr farm. Donata Deko-Pawlik przedstawiła kryteria włączenia oraz charakterystykę analizowanych grup. Jako kryteria rozpoznania stanu przedrzucawkowego Doktorantka zgodnie z wytycznymi Amerykańskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników z 2013r, przyjęła wartość ciśnienia tętniczego $\geq 140/90$ mmHg po 20 tygodniu ciąży oraz obecność białkomoczu dobowego > 300 mg. Jednakże zakres wieku ciążowego w grupie badanej obejmuje 19 tydzień ciąży co nie jest zgodne z przyjętym kryterium. W tabeli porównującej charakterystykę analizowanych grup ciężarnych nie znalazły się informacje dotyczące BMI oraz przeszłości położniczej kobiet. Nie podano również odsetka porodów przedwczesnych oraz masy urodzeniowej noworodków. Część z tych danych znalazło się dopiero w rozdziale dotyczącym wyników, chociaż nie było to celem pracy. W podrozdziale dotyczącym metodyki Doktorantka szczegółowo opisała stosowane procesy analizy biochemicznej oraz metod statystycznych.

Wyniki zostały przedstawione na 47 stronach, z użyciem 17 rycin i 36 tabel. W pierwszej części Doktorantka porównała dane dotyczące charakterystyki badanych grup, powtarzając częściowo informacje zawarte w podrozdziale „Materiał”. Niestety nie obliczyła indeksu masy ciała badanych ciężarnych, o wiele bardziej istotnego parametru niż umieszczone w tabeli średni wzrost i masa ciała. Nadwaga i otyłość stanowią bowiem czynnik ryzyka rozwoju preeklampsji. Brak również informacji dotyczącej odsetka pierworódek, u których częściej dochodzi do wystąpienia stanu przedrzucawkowego. W tabeli umieszczono dane dotyczące tygodnia zakończenia ciąży oraz masy urodzeniowej noworodków. Analizując podane zakresy wydaje się

niemożliwością aby w 19 tygodniu ciąży noworodek ważył 620g. W związku z powyższym powstaje pytanie wg jakich kryteriów został obliczony wiek ciążowy. Ze względu na związek preeklampsji z hipotrofia płodu właściwe byłoby również zamieszczenie informacji o odsetku noworodków z niską w stosunku do wieku ciążowego masą urodzeniową (< 10 percentyla). Wymienione parametry biochemiczne w większości oznaczone są jedynie w grupie badanej. W dalszej analizie Doktorantka porównała parametry kliniczne i biochemiczne u ciężarnych z umiarkowanym i ciężkim stanem przedrzucawkowym. Niestety nie podała kryteriów wg jakich zakwalifikowała kobiety do poszczególnych podgrup. Jednym z najczęściej przyjmowanych kryteriów jest wielkość białkomoczu. W tabeli przedstawione wartości w grupie z ciężką preeklampsją wynoszą 500mg/dl (zarówno średnia jak i zakres). Prawdopodobnie jest to związane z metodą oznaczania białkomoczu w badaniu ogólnym moczu (nie ma możliwości oznaczenia ilościowego powyżej 500mg/dl). W ocenie klinicznej białkomoczu przyjmuje się utratę dobową. Doktorantka nie umieściła jednak tych danych.

Przeprowadzona przez mgr farm. Donatę Deka-Pawlik analiza genów wykazała znamienne różnice występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 66A>G genu MTRR w grupie kobiet z preeklampsją i grupie kontrolnej. Obecność genotypu 66GG i allela 66G znacznie częściej stwierdzała u pacjentek z umiarkowaną, a także ciężką postacią PE. Nie zauważyła takich różnic w odniesieniu do badanego polimorfizmu 2756A>G genu MTR. W analizie porównawczej poza nasileniem stanu przedrzucawkowego warto byłoby rozważyć ocenę w zależności od czasu wystąpienia choroby. Badania ostatnich lat wskazują na różną etiopatogenezę wczesnej (przed 34 tygodniem) i późnej (po 34 tygodniu) preeklampsji. Wczesna preeklampsja charakteryzuje się zwykle cięższym przebiegiem i częściej wiąże się z zaburzeniami implantacji i hipotrofią płodu. W tych przypadkach wykazano również skuteczność wczesnej profilaktyki z użyciem kwasu acetylosalicylowego. Profilaktyka powyższa nie jest skuteczna w późnej preeklampsji częściej występującej u kobiet otyłych z cukrzycą ciążową oraz w ciążach wielopłodowych. Mamy wtedy zazwyczaj do czynienia z dużą masą łożyska i lub płodu. Polimorfizmy genów związane z hiperhomocysteinemią powinny częściej występować we wczesnej postaci PE, która występuje rzadziej niż późna preeklampsja. W przedstawionej analizie Doktorantka nie dokonała porównania

występowania polimorfizmów pomiędzy podgrupami z umiarkowanym i ciężkim stanem przedrzucawkowym, a jedynie w odniesieniu do grupy kontrolnej.

W kolejnym etapie analizy mgr farm. Donata Deka-Pawlik odniosła wybrane parametry kliniczne i biochemiczne do występowania poszczególnych genotypów 2756A>G MTR i 66A>G MTRR, nie uzyskując istotnych rezultatów. Analiza poziomu ekspresji mRNA MTR i MTRR w tkance łożyskowej wykazała natomiast istotny statystycznie wzrost ekspresji genu MTR u kobiet ze stanem przedrzucawkowym w porównaniu do zdrowych ciężarnych. Ponadto Doktorantka zaobserwowała 50% redukcję ekspresji genu MTRR u pacjentek z PE w stosunku do grupy kontrolnej. Analiza zależności pomiędzy genotypami polimorfizmu 2756A>G MTR a poziomem ekspresji tego genu w łożysku nie wykazała istotnych statystycznie korelacji. W przypadku polimorfizmu 66A>G genu MTRR zaobserwowała obniżenie poziomu ekspresji tego genu w łożysku u heterozygot 66AG i homozygot zmutowanych 66GG w porównaniu z nosicielami homozygotycznego niezmutowanego 66AA.

Dyskusja została przedstawiona przez Doktorantkę na 33 stronach. W początkowej części przedstawiła skutki zaburzeń metabolizmu folianów i hiperhomocysteinemii w organizmie człowieka ze szczególnym uwzględnieniem ciąży i rozwijającego się płodu. Podkreśliła rolę hiperhomocysteinemii w rozwoju stanu przedrzucawkowego oraz zahamowania wzrastania wewnątrzmacicznego płodu. Następnie opisała wyniki badań łączących poszczególne polimorfizmy genetyczne z występowaniem tych powikłań. Szczegółowo przedstawiła, zarówno w formie opisowej jak i zestawień w tabelach, dotychczasową wiedzę na temat ewentualnych związków pomiędzy badanymi przez nią polimorfizmami genów MTR i MTRR a stanem przedrzucawkowym i zaburzeniami rozwoju płodu. Niestety w tej części zabrakło bezpośrednich odniesień i omówienia wyników uzyskanych przez samą Doktorantkę. W kolejnym etapie dyskusji przeanalizowała literaturę dotyczącą ekspresji łożyskowej badanych genów i słusznie zauważyła wagę własnych wyników. Ogólnie w dyskusji mgr farm. Donata Deka-Pawlik bardzo szeroko, rzeczowo i dokładnie analizuje rolę polimorfizmów genetycznych w etiopatogenezie preeklampsji i powikłań pokrewnych. O jakości i doborze literatury świadczy spis 178 pozycji piśmiennictwa, w którym ponad 40% doniesień pochodzi z ostatniego 5-lecia.

Na podstawie przeprowadzonej analizy badawczej mgr farm. Donata Deka-Pawlik postawiła pięć wniosków odpowiadających postawionym celom pracy. Do

najważniejszych wniosków należy zaliczyć stwierdzenie, iż kobiety będące nosicielkami zmutowanego genotypu 66GG oraz zmutowanego allela 66G mogą być predysponowane do wystąpienia stanu przedrzucawkowego. Natomiast zwiększona ekspresja mRNA genu MTR w połączeniu ze zmniejszoną ekspresją mRNA genu MTRR może sugerować istotną rolę zaburzeń szlaku metabolizmu folianów w kompartmentie łożyskowym w etiologii stanu przedrzucawkowego.

Praca została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Jest napisana poprawnym językiem, a nieuniknione błędy literowe i stylistyczne są nieliczne. Zwraca uwagę kilkukrotne błędne nazwanie zespołu HELLP skrótem HEELP.

Podsumowując pragnę stwierdzić, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr farm. Donaty Deko-Pawlik stanowi ważne opracowanie istotnego problemu badawczego, świadczy o doświadczeniu Autorki w prowadzeniu badań i rozważań naukowych oraz spełnia wszelkie wymogi ustawowe, stawiane pracom na stopień doktora nauk farmaceutycznych.

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wnioski o dopuszczenie mgr farm. Donaty Deko-Pawlik do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a w rezultacie nadanie Jej stopnia doktora nauk farmaceutycznych.



Dr hab. n. med. Dorota Bomba-Opoń

dr hab. n. med.
Dorota A. Bomba-Opoń
*Specjalista Położnictwa
i Ginekologii
1623567*