

Ocena rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych

lek. med. Urszuli Łagan-Jędrzejczyk

pt. „Polimorfizmy genu ABCBI/MDRI a poziom czynników apoptotycznych u chorych na padaczkę leczonych lekami przeciwpadaczkowymi”.

Padaczka uznawana jest za jedną z najstarszych znanych chorób neurologicznych. Charakteryzowana jest jako pierwotna choroba mózgu. Jej wiodącym objawem jest występowanie nagłych zaburzeń elektrochemicznych określonych komórek nerwowych w mózgu. Na świecie choroba ta dotyka około 50 milionów ludzi, natomiast w Polsce liczbę chorych szacuje się na 300-400 tysięcy.

Padaczka to choroba, u podłoża której prawdopodobnie leżą skomplikowane i niejednorodne procesy patofizjologiczne. Odzwierciedla to podział padaczek, zaproponowany przez Komisję ds. Klasyfikacji i Terminologii Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej, na trzy podtypy etiologiczne: genetyczne, metaboliczne oraz o nieznanym przyczynie. Do rozwoju choroby mogą przyczyniać się zarówno czynniki środowiskowe jak i genetyczne. Te ostatnie warunkują powstanie padaczki u około 40% pacjentów, przy czym dziedziczenie ma zwykle charakter wielogenowy. Postęp technik biologii molekularnej w ostatnich latach umożliwił też analizy porównawcze, pozwalające na identyfikację genów istotnych dla rozwoju tej choroby u ludzi. Zmiany ekspresji wielu genów podczas epileptogenezy może wpływać na funkcje kodowanych przez nie białek, co może tłumaczyć obserwowane w przypadkach padaczki zaburzenia czynności kanałów jonowych zarówno bramkowanych potencjałem, jak i ligandem, a także transporterów błonowych. Czynnikiem środowiskowym, który indukuje rozwój padaczki może być infekcja ośrodkowego układu nerwowego, co prowadzi do aktywacji mikrogleju i astrogleju. W pilokarpinowym modelu padaczki uszkodzenie neuronów poprzedzała apoptoza komórek astrogleju. Należy zwrócić uwagę, że stany zapalne mogą także powodować inne czynniki łącznie z rozwojem tej choroby, jak urazy okołoporodowe, urazy czaszkowo-mózgowe, czy choroby naczyniowe. Występowanie napadów padaczkowych i przyjmowanie leków przeciwpadaczkowe powoduje zaburzenia procesów biochemicznych w organizmie. Leki metabolizowane przez wątrobę zwiększają stężenie homocysteiny poprzez wpływ na przemiany witamin z grupy B i obniżenie stężenia folianów. Podwyższone stężenie tego aminokwasu według danych epidemiologicznych występuje u 15 - 40% chorych z padaczką.

Z powyższego, z konieczności krótkiego, wprowadzenia wynika, że lek. Urszula Łagan-Jędrzejczyk w swojej rozprawie podjęła bardzo aktualną tematykę badawczą.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma 102 strony, zawiera 22 ryciny i 22 tabele oraz 235 pozycji piśmiennictwa oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Wstęp przedstawia zagadnienia związane z możliwymi mechanizmami patogenetycznymi padaczki.

W pierwszej części Autorka omówiła zwięźle epidemiologię i możliwe przyczyny padaczki, a także zamieściła trzy tabele, przedstawiające zmiany klasyfikacji napadów padaczkowych według Międzynarodowej Ligi Przeciwpadaczkowej. Omawiając leczenie tej choroby opisała działanie leków przeciwpadaczkowych (LPP) i stosowane strategie.

Wyodrębnioną część wstępu stanowi opis roli genu oporności wielolekowej MDR1(ABCB1) kodującego glikoproteinę P z podrodziny B transporterów wiążących kasetę ATP. Pewnym brakiem redakcyjnym tego fragmentu jest brak bliższego wyjaśnienia, co to jest polimorfizm genowy SNP i jakie ma on znaczenie biologiczne, choć Autorka opisuje możliwe powiązania pomiędzy wybranymi polimorfizmami genu MDR1 a zapadalnością na padaczkę i skutecznością jej leczenia.

Znaczną część wstępu lek. Łagan-Jędrzejczyk poświęciła dwom rodzajom śmierci komórki: mechanizmom apoptozy i autofagii. Opis szlaków molekularnych apoptozy jest w mojej opinii zbyt szczegółowy, zwłaszcza, że w podrozdziale „Homocysteina jako czynnik apoptotyczny” omawiane są inne drogi indukcji programowanej śmierci komórki (PCD). Należy także wziąć pod uwagę, że opisano przynajmniej kilka rodzajów PCD, co może częściowo wyjaśnić omawiane we wstępie (podrozdziały 1.7.10 i 1.8.1) różnice w danych eksperymentalnych dotyczących wpływu leków przeciwpadaczkowych na procesy apoptozy czy autofagii.

Sformułowany przez Aktorkę cel pracy stanowi bardziej wykaz planowanych badań niż zagadnienie poznawcze, którym było określenie możliwego związku pomiędzy polimorfizmami genu ABCB1/MDR1, stosowaniem leków przeciwpadaczkowych oraz stężeniem homocysteiny i metioniny, a apoptozą limfocytów w krwi obwodowej. Zrozumienie celu pracy ułatwiłoby jego podzielenie na cele szczegółowe (odpowiadające określonym hipotezom badawczym).

W rozdziale „Materiały i metody” przedstawiono schemat przeprowadzonych badań, na które uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej. W podrozdziale „Materiał” podano wybrane dane 85 chorych z rozpoznaną padaczką o nieznannej etiologii, stanowiących grupę badaną i 84 ochotników, stanowiących grupę kontrolną. Kryteria włączenia oraz wyłączenia z badań przedstawiono w załączonej tabeli. Opisano także otrzymane przez chorych leczenie.

Podrozdział „Metody” zawiera opisy analizy wybranych polimorfizmów genu ABCB1/MDR1 metodą denaturacji DNA z wysoką rozdzielczością, oceny odsetka komórek apoptotycznych metodą cytometrii przepływowej oraz oznaczania stężenia osoczowej homocysteiny (Hcy) i metioniny (Met) przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną. Niestety, choć procedury wykonywania pomiarów przedstawiono dokładnie, brakuje w nich opisu podstaw teoretycznych danej metody.

Zbędnym jest chyba także podrozdział 3.2.1. „Przygotowanie krwi do badań”, gdyż takie dane powinny znaleźć się przy opisie metod, z których każda wymaga innego przygotowania materiału do oznaczeń. Podobne zastrzeżenia budzą podrozdziały 3.2.2. „Odczynniki chemiczne” i 3.2.3. „Aparatura laboratoryjna”, stanowiące rodzaj „spisu z natury” wszystkich odczynników i sprzętu, użytego w badaniach.

W rozdziale „Wyniki” wydzielono podrozdziały opisujące analizy polimorfizmów genu ABCB1/MDR1 oraz częstości ich występowania, analizy stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami u chorych na padaczkę leczonych LPP [LPP(+)], u chorych przed włączeniem LPP i u osób z grupy kontrolnej. Analizy takie przeprowadzono w zależności od różnych genotypów genu ABCB1/MDR1 a także dla chorych LPP (+) z napadami ogniskowymi, z napadami uogólnionymi oraz w grupie kontrolnej. Dodatkowo dokonano analizy stężenia Hcy i Met oraz poziomu komórek z aktywnymi kaspazami w zależności od rodzaju stosowanej farmakoterapii oraz od czasu trwania leczenia chorych na padaczkę. Rozdział ten zilustrowano dwunastoma rycinami i szesnastoma tabelami.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń, u badanych osób zdrowych i pacjentów, w obrębie genu ABCB1/MDR1 stwierdzono występowanie trzech polimorfizmów C1236T, trzech C3435T (w obu przypadkach genotypy CC, CT i TT) oraz czterech polimorfizmów G2677(A/T) (genotypy GG, GT, TT i AT – ten ostatni tylko u jednej osoby chorej na padaczkę w całej grupie badanej). Częstość występowania tych polimorfizmów nie różniła się w sposób istotny statystycznie pomiędzy badaną grupą zdrowych a chorych.

U osób z padaczką zarówno przed włączeniem leczenia LPP, jak i pobierających LPP zaobserwowano statystycznie istotny wzrost osoczowego stężenia Hcy w porównaniu do osób zdrowych oraz obniżenie stężenia Met, a także obniżenie wartości wskaźnika Met/Hcy.

Uwzględniając polimorfizmy, istotny statystycznie wzrost stężenia osoczowej Hcy u osób z padaczką zaobserwowano w przypadku genotypu CT polimorfizmu C3435T, natomiast obniżenie stężenia Met w przypadkach genotypu CC i CT polimorfizmu C1236T, genotypu CC i CT polimorfizmu C3435T oraz genotypu GG i GT polimorfizmu G2677(A/T). Podobne zależności pomiędzy polimorfizmami a zmianami stężeń metioniny zaobserwowano po oddzielnej analizie statystycznej grupy chorych na padaczkę leczonych LPP z napadami ogniskowymi i z napadami uogólnionymi. Oczywiście, te zmiany stężeń wpływają także na wartość wskaźnika Met/Hcy, który może bardziej uwidoczniać zmiany zachodzące w metabolizmie chorych, niemniej jako pochodna (stosunek stężenia Met do stężenia Hcy) wymagałby w pracy dokładniejszej analizy. Jednakże wskaźnik ten może być dobrym wykładnikiem zmian metabolizmu biotoli u chorych stosujących monoterapię lub politerapię, także w odniesieniu do długości leczenia. Należy tu jednak zwrócić uwagę, że u znacznej części badanych osób musiały występować przynajmniej dwa polimorfizmy genu

ABCB1/MDR1, co utrudnia wnioskowanie o powiązaniu określonego polimorfizmu ze zmianami osoczowych stężeń badanych aminokwasów.

W analizie odsetka apoptotycznych limfocytów w krwi obwodowej, Autorka dokonała rozróżnienia tego procesu na apoptozę wczesną i późną. Przy niskim odsetku komórek apoptotycznych w krwi chorych na padaczkę leczonych LPP (średnia $1,5 \pm 1,1$) tego typu rozróżnienie, w dużej mierze arbitralne, nie ma specjalnego znaczenia patofizjologicznego. Niemniej, w pracy podkreślono tendencję do wzrostu poziomu komórek w późnej apoptozie u wszystkich badanych pacjentów z padaczką, ale tylko u pacjentów otrzymujących LPP zmiany te były istotne statystycznie. Pewne różnice w odsetkach komórek apoptotycznych stwierdzono u osób leczonych LPP, a mających różne polimorfizmy genu ABCB1/MDR1. Istotnie statystycznie obniżenie poziomu komórek we wczesnej apoptozie stwierdzono w przypadkach genotypu GT polimorfizmu G2677(A/T) i CC polimorfizmu C3435T, natomiast w przypadkach genotypu TT polimorfizmu C1236T wzrost odsetka komórek w tym stadium apoptozy. W tym ostatnim przypadku zaobserwowano zwiększenie odsetka apoptotycznych limfocytów. Wzrost odsetka komórek w późnej apoptozie stwierdzono u heterozygot CT polimorfizmu C3435T. Sądzę, że te zmiany w odsetkach limfocytów w różnej fazie apoptozy, choć istotne statystycznie, ze względu na ich niskie wartości, nie mają znaczenia w biologii choroby.

Moje zastrzeżenia budzą niektóre zwroty, użyte przy opisie wyników, z których tylko niektóre cytuję poniżej:

„u chorych na padaczkę genotyp prawidłowy homozygotyczny CC i heterozygotyczny CT wykazywał tendencję do obniżenia częstości”;

„komórki z aktywnymi kaspazami w limfocytach krwi obwodowej”;

„zauważono tendencję do wzrostu poziomu komórek w późnej apoptozie”;

„stosowanie LPP u chorych na padaczkę prowadziło do pojawienia się dodatkowych dodatnich korelacji pomiędzy stężeniem Hcy i stężeniem Met”.

Choć zastrzeżenia te dotyczą tylko strony redakcyjnej, budzą u czytelnika podejrzenia braku staranności przy wykonywaniu badań.

W dyskusji Autorka odniosła się do danych literaturowych wskazujących na rolę apoptozy w rozwoju padaczki oraz możliwy wpływ LLP i wysokiego stężenia Hcy w indukcji PCD. Omówiła czynniki, które mogą wpływać na podwyższenie osoczowego stężenia Hcy i obniżenie takiego stężenia Met u pacjentów chorych na padaczkę. Zwróciła uwagę, że na regulację stężenia osoczowej Hcy u chorych z padaczką leczonych LPP mogły wpływać polimorfizmy genu ABCB1/MDR1. Brakiem w dyskusji jest pominięcie w rozważaniach roli produktu tego genu, którym jest glikoproteina P i możliwego wpływu polimorfizmu na poziom ekspresji genu oraz aktywność syntetyzowanego białka, zwłaszcza spektrum substratowe i efektywność procesu przenoszenia przez błonę.

Rozdział „Wnioski” zawiera stwierdzenia, które wymagałyby uściślenia. Wniosek 1. Warianty genetyczne analizowanych polimorfizmów genu ABCBI/MDRI występują z różną częstością u chorych na padaczkę i osób kontrolnych jest sprzeczny ze stwierdzeniem zawartym w dyskusji, że w badaniach własnych na grupie 169 osób, w tym 85 chorych z padaczką i 84 osobach kontrolnych, nie zaobserwowano istotnej różnicy w częstości występowania genotypów dla żadnego z analizowanych polimorfizmów genu ABCBI/MDRI C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) u chorych na padaczkę w porównaniu z kontrolnymi ochotnikami. Wnioski 2, 3, i 5 zaczynają się od zwrotów: sugeruje się lub uważa się, co nie implikuje żadnego odniesienia do przeprowadzonych badań. Stwierdzenie podane we wniosku 7. nie ma żadnego oparcia w przeprowadzonych badaniach ani w dyskusji.

Obszerne piśmiennictwo, zawierające publikacje w większości z ostatnich kilku lat zarówno w języku polskim jak i angielskim, zostało dobrane właściwie.

Główną wartością recenzowanej pracy jest nowatorstwo podjętej problematyki badawczej i różnorodność metod, użytych do weryfikacji założonych hipotez. Niewątpliwym ograniczeniem, wynikającym prawdopodobnie z możliwości finansowych, jest stosunkowo mała i heterogenna grupa badanych osób. Chociaż praca porusza istotne problemy epileptogenezy, niemniej niektóre, bardzo interesujące zresztą, wyniki badań nie zostały dokładnie opisane ani w pełni wykorzystane w dyskusji.

Uwagi zawarte w recenzji mają w większości charakter natury redakcyjnej, dlatego uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w art.13 ust.4 ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz o zmianie niektórych innych ustaw i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie lek. med. Urszuli Łagan-Jędrzejczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Krzysztof Wiktorowicz

Poznań, 28 czerwca 2018