

## Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Urszuli Łagan-Jędrzejczyk pt.

„Polimorfizmy genu ABCB1/MDR1 a poziom czynników apoptotycznych u chorych na padaczkę leczonych lekami przeciwpadaczkowymi”  
na prośbę Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Brak skuteczności leczenia i postępujące uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego jest częstym problemem w leczeniu wielu chorób neurologicznych, dotyczy również padaczki i jak podaje lek. Urszula Łagan-Jędrzejczyk w rozprawie „mimo obecnych na rynku ponad 20 LPP, zarówno LPP starej generacji (LPP SG), jak i LPP nowej generacji (LPP NG), nadal 30-40% pacjentów rozwija lekooporność”. Zjawisko to stanowi ciągle niewątpliwie duży problem terapeutyczny i uzasadnione jest kontynuowanie badań w celu poznania bliżej mechanizmów.

Na podstawie dotychczasowych badań sugeruje się, że genem prawdopodobnie związanym ze skutecznością leczenia padaczki jest ABCB1/MDR1, gen lekooporności wielolekowej typu-1 (*ang. multidrug resistance-1 gene*), który może być związany także apoptozą.

Jednakże procesy te nie są jeszcze dokładnie poznane, podjęcie powyższych badań przez lek. Urszulę Łagan-Jędrzejczyk jest więc w pełni uzasadnione.

Celem pracy doktorskiej lek. Urszuli Łagan-Jędrzejczyk była analiza częstości występowania polimorfizmów C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) genu ABCB1/MDR1 u pacjentów z padaczką o nieznannej etiologii leczonych LPP, jak również u chorych przed włączeniem terapii tymi lekami oraz u kontrolnych ochotników w populacji polskiej. Analizie poddano także stężenie osoczowych biotoli: homocysteiny i metioniny oraz poziom komórek z aktywnymi kaspazami w limfocytach krwi obwodowej.

Na początku rozprawy lek. Urszula Łagan-Jędrzejczyk podaje definicję padaczki ILAE z 2014 roku, omawia epidemiologię i przyczynę padaczki. Przedstawia klasyfikację ILAE 1981 roku, 2010 roku oraz nową klasyfikację ILAE z 2017 roku. Następnie omawia zagadnienia związane z leczeniem padaczki: podział leków przeciwpadaczkowych, mechanizmy działania, możliwe działania niepożądane leków przeciwpadaczkowych, interakcje między lekami oraz aktualne strategie leczenia padaczki.

Autorka jasno i precyzyjnie przedstawia zagadnienia związane z genem ABCB1/MDR1: opisuje rolę tego genu, znaczenie glikoproteiny P, przedstawia informacje dotyczące polimorfizmów ABCB1/MDR1 - C1236T, C3435T oraz

G2677(A/T): Następne fragmenty Wprowadzenia lek. Urszula Łagan-

Jędrzejczyk poświęca omówieniu procesom apoptozy (szlaki wewnętrzny, zewnętrzny i inne, rola kaspaz, białek Bcl-2 i p53 w procesie apoptozy, a także roli homocysteiny jako czynnika apoptycznego). Sposób przedstawienia zagadnień świadczy o dobrej znajomości problemów przez lek. Urszulę Łagan-Jędrzejczyk, fragment ma niewątpliwie walor dydaktyczny.

Autorka interesująco przedstawiła informacje dotyczące wpływu leków przeciwpadaczkowych na proces apoptozy. Jednakże Ryc 9 wydaje mi się zbyt „odważnym” przedstawieniem wpływu wybranych LPP na proces apoptozy wobec wyników prowadzonych badań i licznych wątpliwości (które też opisuje Autorka w pracy).

Lek. Urszulę Łagan-Jędrzejczyk przedstawiła szczegółowe kryteria włączenia oraz wyłączenia osób w grupie badanej i kontrolnej.

Badaniu poddano 85 osób z rozpoznaną padaczką o nieznannej etiologii w wieku 18-69 lat, w tym 38 kobiet i 47 mężczyzn. Wśród badanych chorych: 11 osób bez LPP z powodu nowo zdiagnozowanej choroby, natomiast 74 pacjentów otrzymywało leczenie różnymi LPP (LPP SG oraz LPP NG), zarówno w monoterapii, jak i w politerapii. Grupę kontrolnych ochotników stanowiły 84 osoby: 42 kobiety i 42 mężczyzn w wieku od 21 do 66 lat.

Autorka szczegółowo opisała przygotowanie krwi do badań (odczynniki chemiczne, aparatura laboratoryjna, analiza wybranych polimorfizmów metodą HRM (*ang. High Resolution Melting*), oznaczanie poziomu komórek apoptotycznych, analizę stężenia osoczowej homocysteiny i metioniny.

Badanie polimorfizmów C1236T, C3435T oraz G2677(A/T) genu ABCB1/MDR1 przeprowadzono metodą HRM, potwierdzoną sekwencjonowaniem. Analizę poziomu komórek apoptotycznych wykonano metodą cytometrii przepływowej, przez identyfikację komórek wykazujących obecność aktywnych kaspaz (m.in. kaspazy-3, -6, -7). Stężenie osoczowej homocysteiny i metioniny oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną HPLC/EC (*ang. High Pressure Liquid Chromatography/Electrochemical Detection*).

Warto tutaj podkreślić dobry warsztat badawczy ośrodka w którym przeprowadzano badania laboratoryjne.

Lek. Urszula Łagan-Jędrzejczyk podaje w pracy, że uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej str 39, kopia nie jest zawarta w rozprawie jako załącznik. Do przeprowadzenia analizy statystycznej użyto adekwatnych testów opisanych na stronie 44.

Przykładowe wyniki analizy i szczegółowe wyniki przedstawione w czytelnych, przejrzystych tabelach (7-22) i rycinach (11-22) bardzo starannie przygotowanych.

Wyniki analizy uzyskanych danych przedstawiono na stronach 45-69, stwierdzono istotne różnice.

Wykazano, że u chorych na padaczkę zarówno schorzenie ( $p < 0,05$ ) a także stosowana farmakoterapia LPP ( $p < 0,01$ ) prowadzą do wzrostu stężenia osoczowej homocysteiny oraz, że LPP wpływają na poziom komórek w późnej apoptozie ( $p < 0,05$ ). Stwierdzono, że do zwiększania poziomu komórek z aktywnymi kaspazami predysponują: wariant CT ABCB1/MDRI C3435T ( $p < 0,05$ ), napady ogniskowe ( $p < 0,05$ ) oraz stosowanie politerapii ( $p < 0,05$ ). Chorzy z genotypem CT C3435T są bardziej narażeni na rozwinięcie hiperhomocysteinemii ( $p < 0,05$ ). Proces wzbudzania kontrolowanej genetycznie śmierci komórki u chorych na padaczkę podczas leczenia LPP ( $p < 0,001$ ) wydaje się być zaangażowana homocysteina przez indukowanie późnej apoptozy.

Dyskusja na stronach 70-76 (krótka !) prowadzona jest w sposób logiczny.

Autorka porównuje wyniki szczegółowe z pracami opublikowanymi, sprawnie cytuje dostępne dane z piśmiennictwa (także prace z innego polskiego ośrodka zajmującego się tym zagadnieniem – Smolarz i wsp. 2017, Pozycja 231 piśmiennictwa).

Wnioski (7) przedstawiono na stronie 77, są one znaczące:

- farmakoterapia LPP u chorych na padaczkę prowadzi do jednoczesnego wzrostu stężenia osoczowej homocysteiny oraz poziomu komórek w późnej apoptozie, homocysteina indukuje proces apoptozy u chorych z padaczką jedynie podczas leczenia LPP,
- warianty genetyczne analizowanych polimorfizmów genu ABCB1/MDRI występują z różną częstością u chorych na padaczkę i osób kontrolnych, szczególnie narażeni na generowanie osoczowej homocysteiny i indukowanie apoptozy wydają się być chorzy z padaczką posiadający heterozygotyczny genotyp CT ABCB1/MDRI C3435T, raczej politerapia niż długotrwała terapia (powyżej 5 lat) zwiększa tendencję do wzrostu stężenia osoczowej homocysteiny i wpływa na poziom komórek apoptotycznych.

Autorka sugeruje, że chorzy z napadami ogniskowymi leczeni LPP wykazują większą tendencję do wzbudzania apoptozy, niż pacjenci rozwijający napady uogólnione.

Ogólny końcowy wniosek o znaczeniu praktycznym: analiza polimorfizmów genu ABCB1/MDR1 wraz z oznaczaniem poziomu czynników apoptotycznych może przyczynić się w przyszłości do stosowania korzystniejszych terapii u chorych na padaczkę (ew. terapia personalizowana).

Zgadzam się z krytyczną opinią Autorki, że względu na małą liczbę badanych osób, wyniki wymagają potwierdzenia na większej grupie osób.

Układ pracy jest typowy, zawiera 102 stron. Piśmiennictwo dobrane odpowiednio (problem redakcyjny od pozycji 100...). Zawarte są spisy tabel i rycin porządkujące schemat pracy oraz streszczenie w j. polskim i j. angielskim. Uwaga redakcyjna: niejednolite stosowanie skrótów LPP str. 32 vs str. 35.

#### Podsumowanie

Lek. Urszuli Łagan-Jędrzejczyk przygotowała rozprawę doktorską starannie, podjęła badanie aktualnego, niewyjaśnionego problemu, dobrze przedstawiła cele badawcze. W pracy zostały zastosowane nowoczesne techniki badawcze, wyniki są wiarygodne, wnioski są prawidłowo sformułowane. Wyniki mają znaczenie praktyczne, mogą służyć do poprawy terapii chorymi z padaczką.

Reasumując - wnioskuję o przyjęcie i dopuszczenie lek. Urszuli Łagan-Jędrzejczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ważność  
15.08.2018

Amela Fojin