



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Zakład Farmakologii Ogólnej i Farmakoekonomiki

Szczecin ul. Żołnierska 48

Sekr. Tel. + 48 91 48 00 951

Ocena rozprawy doktorskiej pt.

„Analiza polimorfizmów i ekspresji genów syntazy metioniny (MTR) i reduktazy syntazy metioniny (MTRR) w patogenezie stanu przedrzucawkowego”

mgr farm. Donaty Deka-Pawlik

Stan przedrzucawkowy to powikłanie występujące w przebiegu około 5-10% wszystkich ciąż, które mimo znacznego postępu medycyny perinatalnej, nadal stanowi poważne zagrożenie dla matki i płodu. Choroba zaliczana jest do jednej z głównych przyczyn zgonów pacjentek ciężarnych, płodów i noworodków na całym świecie. W przebiegu stanu przedrzucawkowego dochodzi do wzrostu ryzyka przedwczesnego oddzielenia łożyska i porodu przedwczesnego, hipotrofii oraz obumarcia wewnątrzmacicznego płodu. Przeprowadzone badania wskazują na wieloczynnikowe podłoże preeklampsji, jednak etiologia tego stanu nie została w pełni wyjaśniona. Ważną rolę w patomechanizmie choroby odgrywa niedokrwienie łożyska i uszkodzenie śródbłonna naczyńowego, jednocześnie podkreślane jest znaczenie niewłaściwej regulacji układu immunologicznego matki. Liczne analizy wskazują także na istnienie podłoża genetycznego stanu przedrzucawkowego, a wśród polimorficznych wariantów genowych mających znaczenie w rozwoju tego schorzenia wymieniane są geny wpływające na regulację ciśnienia krwi. Rozwój stanu przedrzucawkowego warunkować mogą również geny związane z metabolizmem folianów. Fakt ten potwierdzają badania dotyczące polimorfizmu 677C>T genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR), który koreluje z występowaniem hiperhomocysteinemii, podwyższonym ryzykiem chorób układu sercowo-naczyniowego, a w tym nadciśnienia tętniczego. U kobiet ciężarnych nosicielek tego polimorfizmu częściej obserwuje się wystąpienie stanu przedrzucawkowego, ograniczenia wzrastania wewnątrzmacicznego oraz obumarcia płodu.

Pani mgr Donata-Deka Pawlik słusznie podkreśla, iż ważne jest podjęcie prób wyjaśnienia przyczyn i zapobiegania skutkom powikłań stanu przedrzucawkowego. Doktorantka zwraca uwagę, iż istotną rolę w patogenezie preeklampsji mogą odgrywać czynniki genetyczne związane z metabolizmem folianów w tym polimorfizmy 2756A>G syntazy metioniny i 66A>G reduktazy syntazy metioniny, których warianty warunkują aktywność enzymów i mogą być przyczyną hiperhomocysteinemii, uszkodzenia śródbłonnków i aktywacji trombocytów. Autorka podkreśla, iż podwyższony poziom homocysteiny koreluje z rozwojem szeregu powikłań w przebiegu ciąży w tym także ze stanem przedrzucawkowym. Dlatego podjęcie przez Panią mgr Donatę Deka-Pawlik badań mających na celu 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 w grupie kontrolnej oraz określenie zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami genów *MTR* i *MTRR* a poziomem ich ekspresji w łożysku jest w pełni uzasadnione z punktu widzenia etiologii i prewencji stanu przedrzucawkowego.

Treść przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej liczącej 132 strony, zawierającej 45 tabel i 25 rycin odpowiada tematowi określönemu w tytule, jak również tytułom poszczególnych rozdziałów i podrozdziałów.

We Wstępie, stanowiącym część teoretyczną pracy, Pani mgr Donata Deka-Pawlik przedstawia w sposób świadczący o dużej wiedzy merytorycznej zagadnienia związane z patogenezą stanu przedrzucawkowego. Omawia czynniki ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego, powikłania wynikające z obecności tego schorzenia oraz przedstawia schemat postępowanie terapeutycznego w przypadku wystąpienia preeklampsji. We Wstępie Autorka przedstawia także udział czynników genetycznych w etiologii stanu przedrzucawkowego, a przede wszystkim rolę jaką pełnią enzymy tj. synteza metioniny i reduktaza syntazy metioniny w metabolizmie folianów. Układ Wstępu pozwala tym samym na lepsze zrozumienie tematu podjętego w rozprawie doktorskiej. Ponadto Wstęp z wyszczególnionymi podrozdziałami, napisany w oparciu o przegląd odpowiednio dobranych pozycji piśmiennictwa dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem badań i uzasadnia naukowe założenia rozprawy.

Cel pracy został jasno i logicznie sformułowany. Dodatkowym atutem są cele szczegółowe, które precyzują zakres podjętych przez Doktorantkę badań.

W badaniu wykorzystano materiał kliniczny w postaci fragmentu łożyska oraz próbki krwi obwodowej pochodzący od 98 kobiet ze stanem przedrzucawkowym i 120 zdrowych kobiet ciężarnych. Kobiety ze stanem przedrzucawkowym zostały podzielone dodatkowo na dwie podgrupy tj. kobiety z umiarkowaną i ciężką postacią preeklampsji, co stanowi dodatkowy aspekt w zakresie

wyjaśniania patogenezы tego schorzenia. Analizę częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów 2756A>G genu syntazy metioniny (*MTR*) oraz 66A>G genu reduktazy syntazy metioniny (*MTRR*) w badanych grupach przeprowadzono stosując technikę PCR-RFLP, natomiast poziom ekspresji tych enzymów w łożysku oceniono wykorzystując PCR w czasie rzeczywistym. Określono również zależność pomiędzy badanymi polimorfizmami genów syntazy *MTR* i reduktazy *MTRR* a poziomem ich ekspresji w łożysku u kobiet ze stanem przedrzucawkowym, co niewątpliwie warunkuje oryginalność przeprowadzonych badań.

W aspekcie wykonawczym przedstawiona dysertacja zasługuje na bardzo duże uznanie. Doktorantka precyzyjnie zaplanowała i przeprowadziła badania z zastosowaniem wielu metod m.in. wykorzystując technikę PCR-RFLP oraz real-time PCR. Wszystkie procedury postępowania zostały dokładnie opisane. Wykonano serię pracochłonnych analiz, które wymagały nie tylko wiedzy teoretycznej, ale także umiejętności manualnych. W pracy Autorka z dużą swobodą, świadczącą o doskonałym opanowaniu warsztatu badawczego, posługuje się precyzyjnym nazewnictwem w zakresie pomiaru poziomu mRNA i oceny rozkładu genotypów badanych polimorfizmów w analizowanych grupach kobiet.

Wyniki badań prezentowane przez Panią mgr Donatę Deka-Pawlik zostały przedstawione w sposób uporządkowany i precyzyjny. Doktorantka dowiodła, że polimorfizm 66A>G genu reduktazy *MTRR* może wiązać się z ryzykiem wystąpienia stanu przedrzucawkowego u kobiet ciężarnych będących nosicielkami zmutowanego genotypu 66GG oraz zmutowanego allelela 66G. Zależności tej nie zaobserwowano w przypadku analizy polimorfizmu 2756A>G genu syntazy *MTR*. Najbardziej interesującą jest przeprowadzona obserwacja sugerująca wpływ wariantów zawierających co najmniej jeden zmutowany allel polimorfizmu 66A>G genu reduktazy syntazy *MTRR* na obniżenie poziomu jego ekspresji mRNA w łożysku u ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym. Rezultaty otrzymane w niniejszej rozprawie doktorskiej dostarczają nowatorskich informacji podkreślających, iż zwiększona ekspresja mRNA genu syntazy *MTR* w połączeniu ze zmniejszoną ekspresją mRNA genu reduktazy *MTRR* może sugerować istotną rolę zaburzeń szlaku metabolizmu folianów w kompartmentie łożyskowym w etologii stanu przedrzucawkowego.

W rozdziale Dyskusja Autorka w sposób inteligentny i rzeczowy omawia rezultaty badań porównując je z faktami naukowymi z piśmiennictwa. Dyskusja przeprowadzona jest w sposób wnikliwy, co świadczy o dużej wiedzy naukowej Doktorantki. Należy podkreślić, iż doniesienia zarówno w zakresie częstości występowania polimorfizmów badanych genów syntazy *MTR* oraz reduktazy *MTRR*, jak również ich ekspresji w łożysku w dostępnej literaturze naukowej są bardzo

nieliczne. Fakt ten dobitnie wskazuje na aspekt nowości badań podjętych przez mgr Donatę Dekę-Pawlik.

Wnioski zawarte w pięciu punktach zostały sformułowane prawidłowo na podstawie uzyskanych wyników. Wnioski te wskazują na możliwy udział badanych polimorfizmów w etiologii stanu przedrzucawkowego, jak również na możliwość wyodrębnienia w przyszłości grup ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego.

W uwagach pragnę zaznaczyć, że podczas przygotowania tekstu do druku należy jeszcze raz uważnie przeczytać całą rozprawę pod kątem wyeliminowania przypadkowych literówek. W tabeli 1 na stronie 34 zauważono także nieprawidłowość w podanym zakresie tygodnia ukończenia ciąży w grupie badanej kobiet z preeklampsją. Autorka podała tutaj zakres 19-40 tc., prawdopodobnie zakres ten to 29-40 tc., co może odpowiadać podanej masie noworodka 620 g przy istniejącej jednocześnie hipotrofii płodu. Powyższe fakty nie umniejszają walorów recenzowanej rozprawy.

Podsumowując pragnę zaznaczyć, że przedstawiona mi do oceny rozprawa w całości napisana została językiem poprawnym i zrozumiałym. Autorka korzystała w większości z aktualnego, światowego piśmiennictwa obejmującego 178 pozycji. Zaletą omawianej rozprawy jest niewątpliwie wybór interesującej i aktualnej tematyki, zastosowanie poprawnych metod badawczych, właściwie opracowane wyniki oraz kompetentna i wnikliwa dyskusja. Pozwoliło to na sformułowanie adekwatnych wniosków, świadczących o dojrzałości naukowej Doktorantki. W całości prezentowana rozprawa świadczy o umiejętności rzetelnego prowadzenia prac doświadczalnych i właściwej prezentacji wyników. Uważam, że dysertacja prezentuje wysoki poziom merytoryczny i w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk farmaceutycznych.

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Donaty Dekę-Pawlik do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej.

Szczecin, 12.02.2015

Prof. dr hab. n. med. Bogusław Czerny