

O C E N A

rozprawy doktorskiej lek. med. Agnieszki Pietruszyńskiej-Reszetarskiej pt: „Ocena wpływu zaburzeń metylacji uwarunkowanych polimorfizmem genu reduktazy metyltetrahydrofolianowej (MTHFR) na metabolizm folianów (kwas foliowy, 5-MTHF) u pacjentów z chorobą wieńcową.”

Problem chorób układu sercowo-naczyniowego jest niezwykle istotny w całokształcie funkcjonowania systemu opieki zdrowotnej, ale również ma wymiar społeczny, zwłaszcza w odniesieniu do działań w obrębie polityki zdrowotnej, społecznej i ekonomicznej. Choroba wieńcowa jest najczęstszą przyczyną zgonów wśród Europejczyków. Jest ona wywołana wieloma czynnikami uwarunkowanymi środowiskowo i genetycznie, a udział czynników uwarunkowanych genetycznie według różnych źródeł może być znaczący. Pomimo ogromnego postępu dokonanego zarówno w diagnostyce jak i leczeniu choroby wieńcowej w dalszym ciągu trwają intensywne badania nad genotypowymi i fenotypowymi wykładnikami choroby wieńcowej. Badania struktury i funkcji genów dzięki rozwojowi metod biologii molekularnej pozwalają na ocenę udziału czynników genetycznych w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego, a zwłaszcza choroby wieńcowej prowadzącej do niedokrwienia mięśnia sercowego. Badania w tym zakresie mogą zatem być pomocne w identyfikacji osób z grupy wysokiego ryzyka wystąpienia choroby wieńcowej przy użyciu molekularnej diagnostyki genetycznej i pozwolą na wczesne zastosowanie działań profilaktycznych i poprawę rokowania. Dlatego też wszelkie projekty badawcze poświęcone tej problematyce są jak najbardziej zasadne i konieczne.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lek. Agnieszki Pietruszyńskiej-Reszetarskiej poświęcona jest ocenie wpływu zaburzeń metylacji uwarunkowanych polimorfizmem genu reduktazy metyltetrahydrofolianowej (MTHFR) na metabolizm folianów (kwas foliowy, 5-MTHF) u pacjentów z chorobą wieńcową.

Rozprawa lek. Agnieszki Pietruszyńskiej-Reszetarskiej zawiera 158 stron wydruku komputerowego, z czego 142 strony przypadają na tekst łącznie z dokumentacją, 11 stron na piśmiennictwo, 4 strony na streszczenie w języku polskim i angielskim, 5 stron na spis tabel i rycin oraz 5 stron z wykazem skrótów używanych w pracy.

Dokumentacja pracy zawiera 16 tabel i 14 rycin rozmieszczonych w tekście.

W obszernym teoretycznym wstępie zawartym na 52 stronach rozprawy Doktorantka przedstawiła epidemiologię choroby niedokrwiennej serca i choroby wieńcowej przybliżając patogenezę niedokrwienia mięśnia sercowego oraz czynniki ryzyka choroby wieńcowej. Następnie przedstawiła informacje dotyczące obrazowania blaszek miażdżycowych oraz inwazyjnej diagnostyki i leczenia choroby wieńcowej.

W kolejnym fragmencie wstępu Autorka skupiła się na przedstawieniu nowych obszarów badań związanych z poszukiwaniami biomarkerów choroby wieńcowej zwłaszcza z wykorzystaniem biologii molekularnej i genetyki medycznej. W tej części wstępu Autorka przedstawiła również dostępne dane dotyczące genomiki, epigenetyki i genetycznego podłoża choroby wieńcowej, a także aktualne możliwości diagnostyki genetycznej. W końcowej części wstępu znalazły się informacje dotyczące zaburzeń szlaku komórkowego metylacji w patogenezie miażdżycy oraz czynników wpływających na proces metylacji. W zakończeniu wstępu Doktorantka przybliżyła dane dotyczące zaburzeń metylacji uwarunkowanych genetycznie ze szczególnym zwróceniem uwagi na polimorfizm genu reduktazy metyltetrahydrofolianowej (MTHFR) oraz rolę aktywnej postaci kwasu foliowego – metyltetrahydrofolianu(5-MTHF) jako biomarkera i farmaceutyka.

Po teoretycznym wstępie Doktorantka przeszła do sformułowania celu swojej pracy, z którego wynika, że postanowiła Ona poszukiwać nowych genotypowych i fenotypowych czynników ryzyka rozwoju choroby wieńcowej.

Aby zrealizować cel główny pracy Autorka postawiła pięć hipotez badawczych:

1. Zaburzenia metylacji uwarunkowane polimorfizmem genu MTHFR (IM+) występują częściej u pacjentów z chorobą wieńcową (CAD+) w porównaniu do populacji bez choroby wieńcowej (CAD-).
2. W grupie pacjentów z (CAD+) oraz z zaburzeniami metylacji (IM+) uwarunkowanymi polimorfizmami genu MTHFR występuje niższe stężenie 5 – metyltetrahydrofolianu (5-MTHF) we krwi w porównaniu do grupy pacjentów z CAD bez zaburzeń metylacji oraz bez CAD.
3. Stężenie kwasu foliowego w surowicy krwi nie zależy od zaburzeń metylacji uwarunkowanych polimorfizmem genu MTHFR.
4. W grupie pacjentów z chorobą wieńcową (CAD+) oraz zaburzeniami metylacji (IM+) uwarunkowanymi polimorfizmami genu MTHFR występuje wyższe stężenie homocysteiny (Hcy) oraz zależne od niej stężenia cysteiny (Cys) we krwi w porównaniu do grupy pacjentów z CAD bez zaburzeń metylacji oraz bez CAD.
5. W grupie pacjentów (CAD+) oraz z zaburzeniami metylacji (IM+) uwarunkowanymi polimorfizmami genu MTHFR występuje niższe stężenie zredukowanego glutationu (GSH) oraz

zależne od niego stężenie cysteinyloglicyny (CysGlyc) we krwi w porównaniu do grupy pacjentów z CAD bez zaburzeń metylacji oraz bez CAD.

Tak postawiony cel pracy uważam za przemyślany, interesujący badawczo i możliwy do realizacji.

Z danych przedstawionych w rozdziale „Materiał i metody” wynika, że Doktorantka zastosowała właściwie dobrany materiał badawczy oraz adekwatne do celu pracy nowoczesne metody badań. Łącznie do badań pobrano krew pełną żylną od 213 pacjentów zakwalifikowanych i włączonych do badania w okresie od lutego 2020 roku do października 2022 roku. Spośród tej liczby analizie poddano 42 pacjentów CAD+ (38 mężczyzn i 4 kobiety średni wiek 53 lata, średni wiek rozpoznania CAD 47,1 lat. Pacjenci ci mieli wykonaną koronarografię w trybie planowym lub z powodu ostrego zespołu wieńcowego.

Grupę kontrolną stanowiło 16 pacjentów CAD-, (12 mężczyzn i 4 kobiety), u których nie stwierdzono przewężeń w tętnicach wieńcowych zgodnie z kryteriami kwalifikacji do tej grupy. Grupę badaną podzielono w zależności od obecności choroby wieńcowej oraz od obecności zaburzeń metylacji uwarunkowanej polimorfizmami genu MTHFR c.665C>T (rs1801133) oraz c.1286A>C (RS1801131).

DNA wyizolowywano z krwi obwodowej pobranej od pacjentów z żyły odłokciowej przy użyciu zestawu do izolacji DNA GeneeMatrix (EURx, Gdańsk, Polska).

Do oznaczania polimorfizmów genu MTHFR c.665C>T (rs1801133) oraz c.1286A>C (rs1801131) wykorzystano metodę Real-time PCR i zestaw do genotypowania TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Stężenia kwasu foliowego, 5 – metyltetrahydrofolianu (5 – MTHF) oraz endogennych tioli – homocysteiny (Hcy), cysteiny (Cys), cysteinyloglicyny (CysGlyc) i zredukowanego glutationu (GSH) oznaczano przy wykorzystaniu metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań przeprowadzona została w Katedrze Nauk Biomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi przy użyciu programu Statistica v. 12.5 oraz „nakładki” do programu Excel: Resampling Stats Add-in for Excel v. 4.

Wyniki badań przedstawiono wykorzystując takie instrumenty analizy statystycznej jak: średnia, \pm odchylenie standardowe (SD) i medianę. Normalność rozkładów danych zweryfikowano testem Shapiro-Wilka. Zastosowano również test Browna-Forsythe’a, test U – Manna-Whitneya oraz test t – Studenta.

Na badania wyraziła zgodę lokalna Komisja Bioetyczna Uniwersytetu medycznego w Łodzi: Zgoda Nr RNN/78/19/KE z dnia 12 lutego 2019 roku.

Uzyskane wyniki badań przedstawione zostały przejrzysto na 27 stronach rozprawy w formie 7 tabel i 9 rycin.

Jak wynika z badań dotyczących polimorfizmu genu MTHFR (IM+) wykazały one, że polimorfizm c.[1286A>C];[1286A>C] genu MTHFR (homozygota c.1286 A>C) występował istotnie statystycznie częściej u pacjentów z grupy (CAD+) w porównaniu do pacjentów (CAD-). Ponadto stwierdzono, iż ten homozygotyczny wariant występuje istotnie statystycznie częściej u pacjentów (CAD+) w porównaniu do populacji europejskiej HapMap – CEU wybranej do porównania statystycznego z bazy danych NCBI. Zaobserwowano również częstsze występowanie allelu C (polimorficznego, występującego w homozygocie c.[1286A>C];[1286A>C] i heterozygocie c.[1286A>C];[1286A=]) w grupie pacjentów (CAD+).

W dalszych badaniach Autorka wykazała, że stężenie 5 – metyltetrahydrofolianu (5-MTHF) w grupie pacjentów z zaburzeniami metylacji uwarunkowanymi wariantem polimorficznym c.[1286A>C];[1286A>C] (homozygota c.1286A>C) oraz CAD+ było niższe w porównaniu do grupy pacjentów (CAD-) z tym genotypem lecz nie była to różnica istotna statystycznie.

Kolejnym interesującym spostrzeżeniem Autorki jest to, że stężenie kwasu foliowego w grupie pacjentów z zaburzeniami metylacji uwarunkowanymi wariantem polimorficznym c.[1286A>C];[1286A=] (heterozygota c.1286A>C) oraz (CAD+) było niższe w porównaniu do grupy pacjentów (CAD-) z tym genotypem, a zaobserwowana różnica była statystycznie nieistotna.

Wyniki dotyczące stężenia homocysteiny i cysteiny w surowicy krwi u pacjentów poddanych badaniom nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupą pacjentów (CAD+) w porównaniu z grupą (CAD-) jak również w grupie pacjentów z (CAD+/IM+) w porównaniu do grupy pacjentów (CAD-).

Zaprezentowane wyniki badań dotyczące zachowania się endogennych tioli, wykazały, że stężenie zredukowanego glutationu we krwi pobranej od pacjentów z (CAD+) było niższe niż w grupie pacjentów (CAD-), a różnica ta była bliska wartości krytycznej. Stwierdzono także istotnie niższe stężenia cysteinyloglicyny w surowicy krwi w grupie pacjentów (CAD+) w porównaniu do grupy (CAD-). Ta zależność była również istotna statystycznie dla grupy z chorobą wieńcową i zaburzeniami metylacji uwarunkowanymi polimorfizmem genu MTHFR.

Podsumowując swoje badania zwróciła Doktorantka uwagę na bardzo istotny ich element pokazujący, że u pacjentów z angiograficznie potwierdzoną chorobą wieńcową (CAD) polimorfizm c.[1286A>C];[1286A>C] genu MTHFR (homozygota c.1286A>C) był istotnie związany z częstością występowania CAD, i pomimo jak słusznie zauważa Autorka nielicznej grupie pacjentów poddanej badaniu, związek jaki zaobserwowała cechowała zmienność statystyczna wskazująca tym samym na znaczenie tego polimorfizmu w etiologii CAD.

W rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” zawartym na 12 stronach rozprawy Doktorantka poddała wnikliwej i przemyślanej analizie wyniki badań własnych i skonfrontowała je

z aktualnymi danymi z piśmiennictwa. Ta część rozprawy świadczy o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Autorki do podjęcia realizowanego projektu badawczego oraz o dużej dojrzałości naukowej.

Rozprawę Autorka kończy pięcioma wnioskami w pełni odpowiadającymi na cel pracy i pięć hipotez badawczych. Należy podkreślić, że mają one przede wszystkim charakter poznawczy jak i również praktyczny.

Po wnioskach Doktorantka zamieściła podsumowanie zawierające informacje wynikające bezpośrednio z wniosków i wyników badań przez Nią uzyskanych.

Bibliografia zawarta na 11 stronach składa się z 188 pozycji anglo- i polskojęzycznych w znaczącej większości z ostatniego dwudziestolecia. Piśmiennictwo przedstawiono w kolejności cytowania w pracy.

Podczas czytania pracy nasunęły mi się uwagi i spostrzeżenia, które z obowiązku recenzenta pragnę przedstawić:

- moim zdaniem wstęp jest zbyt obszerny, stanowi bowiem 50% całej rozprawy, co zaburza nieco strukturę rozprawy,
- podobnie streszczenie pracy znalazło się na samym początku rozprawy zaraz po stronie tytułowej i podziękowaniach,
- cel pracy oddaje tylko pierwsze zdanie. Pozostałe dwie i pół strony mogłoby być zakwalifikowane jako uzasadnienie celu pracy,
- w części metodycznej po charakterystyce badanych grup umieszczony został podrozdział 3.2. Hipotezy badawcze, co również zaburza strukturę pracy. Hipotezy postawione w tym podrozdziale powinny znaleźć się w rozdziale cel pracy.

Pozostałe drobne uwagi stylistyczne i edytorskie omówiłem z Doktorantką i mam nadzieję, że zostaną one wykorzystane przez Autorkę podczas przygotowywania pracy do publikacji. Pragnę jednocześnie podkreślić, że poczynione uwagi w niczym nie umniejszają wysokiej wartości pracy.

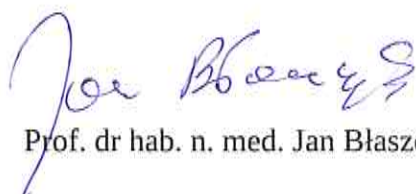
Przedstawiona mi do oceny rozprawa Doktorska dowodzi osiągnięcia zamierzonego celu. Autorka wykazała się rozległą wiedzą i umiejętnie ją wykorzystwała tak w badaniach naukowych jak i pisaniu pracy. Wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę mają bez wątpienia duże znaczenie poznawcze ale również aplikacyjne rzucające nowe spojrzenie na patomechanizm choroby wieńcowej (CAD).

W tym miejscu pragnę pogratulować tak Promotorowi jak i Doktorantce za bardzo celny wybór interesującego problemu badawczego.

Reasumując uważam rozprawę doktorską **lek. med. Agnieszki Pietruszyńskiej-Reszetańskiej** pt: „Ocena wpływu zaburzeń metylacji uwarunkowanych polimorfizmem genu reduktazy metyltetrahydrofolianowej (MTHFR) na metabolizm folianów (kwas foliowy, 5-MTHF) u pacjentów z chorobą wieńcową.” za podejmującą bardzo istotny, wciąż aktualny, ciekawy i praktyczny problem badawczy, zawierającą oryginalne wyniki, należycie przedstawione i właściwie opracowane.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022Poz. 574).

W oparciu o swoją wysoką ocenę pracy składam wniosek do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie lek. med. Agnieszki Pietruszyńskiej-Rzeszetańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. n. med. Jan Błaszczuk