2.01. 2015

Warszawa, dn. 29.12.2014

Prof. dr hab. n med. Ksenia Bykowska

Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Hejduk pt."Badania związku form polimorficznych genu kodującego podjednostkę gamma białka G z rozwojem ryzyka pierwotnego nadciśnienia tętniczego w populacji polskiej".

Nadciśnienie tętnicze jest chorobą XXI wieku. Paradoksalnie na jej pojawienie się ma wpływ postęp cywilizacyjny: nasz styl życia, mała aktywność fizyczna, nieprawidłowe żywienie. Występuje często, bo u około 20-30% polskiej populacji. Jest czynnikiem ryzyka choroby sercowo naczyniowej. Patogeneza nadciśnienia tętniczego jest wieloczynnikowa, wielogenowa i wciąż nie do końca poznana. Postęp w badaniach nad nadciśnieniem tętniczym stał się możliwy dzięki szybkiemu rozwojowi metod biologii molekularnej. Za wystąpienie i rozwój choroby mogą odpowiadać zarówno polimorfizmy genowe jak i czynniki środowiskowe. Uważa się, że w 30-40% wysokość nadciśnienia tętniczego jest uwarunkowane genetycznie. Badania molekularne skupiają się głównie nad ustaleniem wpływu niektórych wariantów genowych na mechanizmy regulujące ciśnienie tętnicze krwi. Do najważniejszych należą geny kontrolujące szlaki renina-angiotensyna-aldosteron, mediatory wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, geny związane z syntezą i działaniem cząsteczek naczynioruchowych, β-adrenergiczny szlak sygnałowy. W regulacji ciśnienia tętniczego ważną rolę odgrywają heterotrimetryczne białka G sprzężone z receptorem α2A-adrenergicznym. Aktywacja receptorów α2A – adrenergicznych, sprzężonych z białkiem G, prowadzi do obniżenia ciśnienia tętniczego poprzez hamowanie wydzielania noradrenaliny z włókien adrenergicznych na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego.

Przedstawiona mi do oceny praca jest opracowaniem liczącym 77 stron. Układ pracy jest typowy dla rozprawy doktorskiej. Dodatkowe 10 stron stanowią 4 suplementy przedstawiające wyniki analizy starterów dedykowanych badanym polimorfizmom, oświadczenie autorki o wyłączności oraz zgoda Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na przeprowadzenie objętych pracą badań.

Praca zawiera wykaz zastosowanych skrótów, 10 tabel, 17 rycin i 161 pozycji literaturowych. Około 40 % pozycji piśmiennictwa to prace z ostatnich 5 lat (66 pozycji) w tym z lat 2013-2014 pochodzi aż 31 prac. Fakt, że Doktorantka przytacza tak dużą liczbę najnowszych prac świadczy o Jej bardzo dobrej znajomości źródłowej literatury oraz aktualności problemu, którym postanowiła się zająć.

Rozprawę doktorską rozpoczyna obszerny wstęp teoretyczny znakomicie wprowadzający w podjęty przez Doktorantkę temat pracy doktorskiej. W trzech pierwszych podrozdziałach wstępu Doktorantka omawia zagadnienia ogólne związane z nadciśnieniem tętniczym a więc kolejno epidemiologię, definicje i obowiązującą obecnie klasyfikację nadciśnienia tętniczego oraz przedstawia stan obecnej wiedzy na temat patogenezy tej choroby. W części epidemiologicznej Doktorantka bardzo wnikliwie analizuje dane pochodzące z lat 1993-2011, omawiając jednocześnie zalety i ograniczenia omawianych przez nią projektów epidemiologicznych. Zwraca uwagę na dobór grupy badanej, przyjmowany zakres wiekowy a także płeć osób objętych programem. Na podstawie aktualnych danych podaje, że częstość występowania nadciśnienia tętniczego w u osób powyżej 18 roku życia w populacji polskiej wynosi średnio 32% przy czym wartość ta zmienia się w zależności od wieku. Autorka przytacza dane prognostyczne sugerujące, że częstość występowania nadciśnienia tętniczego do roku 2035 może wzrosnąć do ponad 50%.

Bardzo dobrze napisany jest podrozdział omawiający w zwięzły sposób udział czynników genetycznych w patogenezie nadciśnienia tętniczego. Doktorantka podkreśla wielogenowość choroby, przedstawia listę genów kandydatów, zwraca uwagę na znaczenie zmienności poszczególnych genów i analizuje wartość kryteriów statystycznych w wyłonieniu genów mogących predysponować do rozwoju nadciśnienia tętniczego. Na szczególne uznanie zasługuje ostatnia część wstępu teoretycznego poświęconą białkom G, białkom, które w sprzężeniu z receptorem α2A adrenergicznym biorą udział w transdukcji sygnału do wnętrza komórki, uczestnicząc w ten sposób w regulacji ciśnienia tętniczego. Doktorantka szczegółowo opisuje zarówno strukturę jak i funkcje rodziny białek G. Podkreśla złożoność ich jest struktury i ich rolę fizjologiczną. Białka G są białkami heterotrimerycznymi, zbudowanymi z 3 podjednostek: Gα, Gβ, Gγ. Podjednostki te są kodowane przez wiele genów. Podjednostka α jest kodowana przez 16 genów (produktami są 23 podjednostki Gα), podjednostka β przez 5 genów (powstaje 5 podjednostek Gβ) i podjednostka Gγ przez 12 genów (powstaje 12 podjednostek Gγ). W dalszej części wstępu Doktorantka omawia aktywację białek G, białka efektorowe regulowane przez podjednostki Gβγ oraz podział, budowę oraz funkcję receptorów adrenergicznych sprzężonych z białkiem G. Opisuje jak zmiany w strukturze heterotrimerycznego białka G spowodowane nieprawidłową budową podjednostki Gγ5 mogą wpływać na regulację ciśnienia tętniczego. Na koniec omawia strukturę genu GNG5 kodującego podjednostkę γ5 białka G i charakteryzuje 5 polimorfizmów

(rs11559300, rs199705300, rs1754630, rs13093, rs41284589) które są tematem badań zaplanowanych w pracy doktorskiej.

Podsumowując, należy podkreślić że część teoretyczną jest napisana w sposób przejrzysty i w pełni uzasadnia znaczenie podjętych przez doktorantkę badań.

W kolejnym rozdziale Doktorantka formułuje w sposób zwięzły i jasny cel pracy doktorskiej, którym jest zbadanie, czy warianty genu GNG5 (rs11559300, rs1997053000, rs61754630, rs41284589 i rs13093) kodującego podjednostkę γ5 białka G mają wpływ na rozwój pierwotnego nadciśnienia tętniczego w populacji polskiej.

W rozdziale „Materiały i metody" Doktorantka opisuje grupy badane i sposób dobierania pacjentów do tych grup. Uwagę zwraca bardzo staranna kalkulacja liczebności grupy badanej i kontrolnej z uwzględnieniem czynników istotnych dla reprezentatywności prowadzonych badań. W podrozdziale „Metody", Doktorantka w sposób szczegółowy omawia zastosowaną w pracy metodę analizy polimorfizmów. Przy pomocy rycin 11-16 charakteryzuje obraz kontrolny dla poszczególnych rozdziałów elektroforetycznych. Uważam, że przyjęta w pracy metoda (RFLP/PCR, restriction fragment lenght polymorphism-PCR) jest adekwatna do zaplanowanych w pracy badań. Należy podkreślić, że warunki reakcji PCR dla każdego pojedynczego nukleotydu były dobierane przez Doktorantkę indywidualnie, w zależności od zastosowanych starterów i długości amplifikowanego fragmentu. Dla każdego badanego polimorfizmu zaprojektowano parę starterów w oparciu o analizę sekwencji nukleotydowej znajdującej się w bazie NCBI (wyniki analizy zaprojektowanych starterów Doktorantka przedstawiła w suplementach 2-4 dołączonych do pracy doktorskiej). Kontrola badań jest dobrana starannie i jest wystarczająca. Podsumowując rozdział „Materiały i Metody" stwierdzam, że Doktorantka wykazała się dużą wiedzą metodyczną (również statystyczną) i dobrym warsztatem laboratoryjnym.

Przedstawione przez Doktorantkę wyniki badań dowodzą, że w pełni zrealizowała zaplanowany cel pracy. Na uznanie zasługuje duża liczebność badanych grup. W badaniach wzięło udział 838 mieszkańców z całej Polski, w tym 536 osób stanowiła grupa badana i 302 osoby grupa kontrolna. Mężczyźni stanowili w tych grupach odpowiednio 46,6% i 51,7%. Minimalna wielkość grupy badanej i kontrolnej została wyliczona na podstawie analizy statystycznej przyjmując, że nadciśnienie tętnicze występuje u 32% populacji polskiej i że 90% osób z nadciśnieniem tętniczym stanowią osoby z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. Minimalna wielkość grupy badanej wynosiła 296 osób.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania dostarczyły trzech ważnych informacji poszerzające naszą wiedzę o podłożu genetycznym pierwotnego nadciśnienia tętniczego.

Doktorantka wykazała, że spośród badanych polimorfizmów genu GNG5 kodującego podjednostkę γ5 białka G: 1/ częstość występowania allelu A polimorfizmu rs13093 jest znamiennie wyższa w całej grupie pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym; 2/ częstość występowania allelu T polimorfizmu rs41284589 jest znacząco wyższa w grupie pacjentów ze stężeniem trójglicerydów <150 mg/dl; polimorfizmy: rs1155930, rs199705300 i rs61754630 wydają się nie mieć wpływu na rozwój pierwotnego nadciśnienia tętniczego.

Dyskusja otrzymanych wyników jest stosunkowo krótka ale odpowiednio wyważona. Doktorantka umiejętnie skonfrontowała uzyskane wyniki z danymi z piśmiennictwa. Wykazała, że przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania korelujące występowanie zmienności w obrębie podjednostki γ5 białka G z występowaniem pierwotnego nadciśnienia tętniczego są jak dotychczas jedynymi badaniami dotyczącymi tej tematyki.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja mgr Pauliny Hejduk pt. „Badanie związku form polimorficznych genu kodującego podjednostkę gamma 5 białka G z rozwojem ryzyka pierwotnego nadciśnienia tętniczego w populacji polskiej" spełnia kryteria pracy doktorskiej i wnioskuję o dopuszczenie mgr Pauliny Hejduk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Zauważone w pracy drobne literówki nie mają żadnego wpływu na wartość pracy mgr Pauliny Hejduk.

Ze względu na merytoryczną wartość pracy, wagę podjętego tematu, dobry warsztat laboratoryjny, dużą liczebność grup badanych co czyni, że uzyskane wyniki są reprezentatywne a także ze względu na przedstawienie nowych dotychczas nie opisywanych zależności polimorficznych, które mogą odgrywać rolę w regulacji ciśnienia tętniczego, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Hejduk.

z poważaniem,

prof. dr hab. n med. Ksenia Bykowska