



UNIwersytet
MEDYCZNY
W ŁODZI

Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakład Genetyki Klinicznej

prof. dr hab. med. Maciej Borowiec
ul. Pomorska 251, A1, 9p
92-213 Łódź
tel/fax: 042 272-57-67
e mail: maciej.borowiec@umed.lodz.pl

Łódź, 14.11.2018r.

Recenzja pracy doktorskiej

pt. „Związek genu indukowanej syntazy tlenku azotu NOS2 z przerostem lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej” wykonaną przez mgr Ewelina Zakościelną w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Nadciśnienia Tętniczego i Angiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, promotor dysertacji prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong.

Stenoza aortalna jest trzecią pod względem częstości występowania chorobą serca w krajach wysokorozwiniętych, powodująca wtórny przerost lewej komory serca, który jest niezależnym czynnikiem ryzyka zgonu i powikłań sercowo-naczyniowych. Brak korelacji pomiędzy stopniem zwężenia zastawki aortalnej a przerostem mięśnia lewej komory serca może sugerować na udział czynników genetycznych w powyższym schorzeniu. Czynniki genetyczne odgrywają zróżnicowaną i nie do końca poznaną rolę w etiopatogenezie zaburzeń strukturalnych jak i przewodnictwa mięśnia sercowego — od wpływu na ryzyko zachorowania i przebieg kliniczny choroby aż do pełnej determinacji wystąpienia schorzenia.

Stenoza aortalna (AS) jest wadą serca polegającą na zmniejszeniu powierzchni lewego ujścia tętniczego co wtórnie wpływa na przerost lewej komory serca. U podłoża stenozy aortalnej leżą głównie wady nabyte pojawiające się w procesach zwyrodnieniowych rzadziej pojawiają się wady wrodzone. U chorych z AS zaleca się wymianę chirurgiczną zastawki oczekując w ten sposób redukcji przerostu lewej komory serca i poprawy jakości życia pacjentów. Jednakże brak efektów po zabiegach chirurgicznych daje podstawy aby sądzić że czynniki genetyczne odgrywają istotną rolę w powyższym procesie. Przerost lewej komory serca determinowany jest przez czynniki demograficzne (płeć, wiek, rasa, używki i inne), hemodynamiczne (ciśnienie krwi, lepkość, struktura naczyń) oraz inne niż hemodynamiczne (układ renina-angiotensyna-aldosteron, czynniki genetyczne). W literaturze fachowej

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej

92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 272 57 67
e-mail: katedra.genetyki@umed.lodz.pl
w4u.umed.lodz.pl/~genetyka



znajdziemy bardzo dużo prac skupiających się na analizie czynników genetycznych powiązanych z powyższą chorobą. Analiza genów kandydatów czy badania cało genomowe (GWAS) na chwile obecną nie tłumaczą w pełni podłoża zagadnienia, nie jednokrotnie negując badania już opublikowane czy też brak jest walidacji wyników na innych grupach badawczych. Badania genów ACE, układu genów) RAAS, GWAS czy Framingham Study są źródłem wiedzy na temat genetycznych zaburzeń układu sercowo-naczyniowego, jednak nie w pełni tłumaczą i dają odpowiedzi na pytania grup naukowych czy samych klinicystów. Duże znaczenie w przeroście lewej komory serca w ostatnich latach upatruje się w funkcji syntazy tlenu azotu i jej roli w patogenezie powyższego schorzenia. Złożoność problemu, indukcja szlaków sygnałowych, budowy białka jak również poszukiwania czynników indukcyjnych syntazy tlenu azotu do chwili obecnej nie jest rozwiązana. Choć mnogość publikacji na ten temat pozwala sądzić o jej znaczącym udziale w chorobie.

Doktorantka mgr Ewelina Zakościelna w swojej pracy doktorskiej przyjęła za główny cel określenie związku czynników genetycznych występujących w locus genu *NOS2* z przerostem mięśnia lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej. Miejsce prowadzenia badań, profil pacjentów i spektrum problemów z jakimi spotyka się zespół specjalistów Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Nadciśnienia Tętniczego i Angiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego nie dziwi więc decyzja nad podjęciem wyzwania wysoce ambitnego. W związku z tym, wybór przez Pana Promotora i Doktorantkę tej tematyki badań uważam za bardzo interesujący i w pełni uzasadniony.

Recenzowana praca doktorska jest dysertacją liczącą 107 strony zawierającą 5 rycin, 25 tabel i 185 pozycji literaturowych w większości pochodzących z ostatniego okresu czasu, które posłużyły do przygotowania monograficznej części poglądowej, doświadczalnej oraz dyskusji nad wynikami badań własnych. Dobór pozycji literaturowych nie budzi zastrzeżeń i wskazuje na to, że tematyka badań jest bardzo aktualna.

Pracę rozpoczyna część teoretyczna licząca 36 stron; zawiera 1 rycinę oraz 1 tabelę w pełni przedstawiającą i pozwalającą zrozumieć charakter i skalę trudności tematu. Osobne rozdziały części teoretycznej stanowią zamierzone przejście do obszernego omówienia etiopatogenezy, podłoża fizjologicznego i molekularnego rozrostu lewej komory serca i wad zastawek będących zarówno przyczyną jak i skutkiem zaburzeń rozrostowych. Po krótkim wprowadzeniu, dotyczącym wad zastawki aortalnej (stenozy aortalnej oraz przerostu lewej komory serca, Doktorantka omówiła brak klarownych przesłanek co do etiopatogenezy powyższych zwracając uwagę na znaczenie podłoża genetycznego i





braku ewidentnych danych naukowych na jednoznaczne wyjaśnienie powyższych problemów. Przedstawione przez Doktorantkę płaszczyzny analizy zmiennych genetycznych i powiązania zmian genetycznych odpowiedzialnych za badane zjawiska, ich różnorodność jak np. gen *ACE*, geny RAAS czy analizy całego genomu GWAS, przedstawia pracę jako niezwykle ciekawą i ambitną a nasuwające się przypuszczenia co do narzędzi analitycznych budzi ciekawość recenzenta. Pokazując niezwykle wysoki poziom trudności tematu.

Przygotowany przez mgr Ewelinę Zakościelną przegląd piśmiennictwa stanowi oryginalnie przemyślany, wyjątkowo interesujący i świetnie zilustrowany wykład na temat podłoża molekularnego udziału *NOS2* w patogenezie przerostu lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej dokumentując, że szybka i prawidłowa diagnostyka pozwoli na właściwe leczenie, przewidywanie i zmniejszenie powikłań. Autorka dowiodła, że potrafi wykorzystywać dostępne dane literaturowe, twórczo je opracowywać, systematyzować i komentować. Przygotowana część teoretyczna nadaje się na bardzo dobry artykuł przeglądowy do którego z całym przekonaniem namawiam.

Część doświadczalna pracy obejmuje 43 stron. Poświęcona jest charakterystyce grup badanych, jakości i normalizacji cząstek materiału genetycznego na którym prowadzono badania oraz przedstawieniu metod oceny różnic genetycznych na podstawie których poszukiwano powiązania choroby z podłożem genetycznym. Opisanie procedur metodycznych zastosowanych w prezentowanych badaniach, przedstawieniu uzyskanych wyników oraz ich interpretacji w kontekście danych opublikowanych przez innych autorów.

Rozdział „Założenia i cele pracy” wskazuje, iż Autorka postanowiła, w ramach założonego nurtu badań i w oparciu o zreferowane wcześniej przesłanki teoretyczne, w praktyce wypełnić określając czynniki genetyczne i mechanizmy molekularne związane z przerostem lewej komory serca polegające na identyfikacji czynników genetycznych (polimorficznych loci) znajdujących się w obszarze genu *NOS2* potencjalnie związanych z klinicznym obrazem choroby. Kolejne rozdziały pokazują, jak te zamierzenia zostały zrealizowane.

Przystępując do oceny merytorycznej tej części recenzowanej rozprawy, muszę podkreślić, że prezentowane w niej badania zostały zaplanowane bardzo wszechstronnie, z uwzględnieniem doświadczeń analizujących różne uwarunkowania poszczególnych zagadnień. Oparto je o bardzo nowoczesne, trudne techniki eksperymentalne biologii molekularnej min. Analizę polimorficznych loci i wytypowanie polimorfizmów wiodących (tagging SNP). Identyfikując je nie tylko z danych





literaturowych ale też z własnych analiz z wykorzystaniem dostępnych baz danych jak HapMap Project i reanalizy polimorfizmów wiodących wykorzystując oprogramowanie HaploView, modelując różne scenariusze analiz jednocześnie zmieniając kryteria oceny siły powiązania i grup opisujących obszary chromosomowe za pomocą polimorficznych loci. Autorka przedstawiła również technikę genotypowania SNPlex analizując 24 polimorficzne loci obszaru genu *NOS2*, GoldenGate oraz technikę ASPE. Techniki ta wymaga od operatora wiedzy i niezwyklej skrupulatności prowadzonych doświadczeń. Wymaga zastosowania etapów fragmentacji, ligacji, hybrydyzacji z sondami ZipChute co świadczy o dokładnym przemyśleniu problemu przez Doktorantkę.

Badania po uprzednim uzyskaniu zgody Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Warszawie (KB/106/2007, KB/74/2012, KB/119/A/2013) przeprowadzono na grupie chorych z rozpoznaną AS (stenoza aortalna) n=657. Chorzy byli hospitalizowani w Klinice Wad Nabytych Serca Instytutu Kardiologii w Warszawie. Dobór grupy jest niezwykle precyzyjny i dokładnie scharakteryzowany a wyczerpujące dane Doktorantka zawarła w tabeli 2.

Doktorantka w niniejszej rozprawie odnosi się do kilkunastu raportów naukowych stwierdzających powiązanie analizowanego problemu z podłożem genetycznym. Przytacza nazwy genów, ich lokalizacje oraz polimorficzne loci zaangażowane w rozwój choroby. Jednak jak sama stwierdza dane te są nie kompletne, nie zweryfikowane i nie do końca przekonujące np. genu *ACE*, *AGT*, *IGF-1*..i wielu innych pochodzących również z badań cało genomowych GWAS. Przedstawia też analizę opublikowanych wariantów genetycznych genu *NOS2*, pokazując ich nie konsekwencje, małą wartość statystyczna jak też różnorodność grup badanych i brak walidacji na innych populacjach.

Dlatego też sama skupia się na analizie haplotypowej obszaru genu *NOS2*, wyznaczeniu bloków haplotypowych, wyborze polimorfizmów znacznikowych oraz podejmuje się przypisaniu funkcji powyższym polimorfizmów w analizach *in silico*.

Posługując się narzędziami bioinformatycznymi wyznacza haplo bloki powyższego obszaru i wyznacza polimorfizmy znacznikowe (24 polimorfizmy) niezbędne do zapewnienia pokrycia większości zmienności genetycznej w obszarze genu *NOS2*. Następnie analizuje [owyzsze 24 polimorfizmy pod kątem związku cech fenotypowych w modelach genetycznych : dominującym, addytywnym oraz recesywnym. Identyfikując powiązanie części polimorfizmów z współczynnikiem RWT, wyniki obrazują tabele 11-13. Analiza haplotypowa wykonana przez Doktorantkę, identyfikuje 5 silnie definiowanych haplobloków w pełni opisujących zmienność genetyczną locus genu *NOS2* –



dane zawarte w tabelach 14-23. Powyższe dane wykazują znamienneści statystyczne haplobloków jak i kodujących je polimorfizmów z względnym współczynnikiem grubości lewej komory serca w modelu prostym oraz pełnym dla całej grupy badanej jak i grupy mężczyzn. Nie obserwowano istotnego związku wariantów genu *NOS2* z RWT dla grupy kobiet. Przeprowadzając analizę imputacji polimorfizmów locus genu *NOS2*, Doktorantka wskazała polimorfizm rs944725 w lokalizacji intronowej między eksonami 5 i 6 genu jako prawdopodobny wskaźnik dla polimorfizmu funkcjonalnego w modelu prostym $p=0,00402$ i modelu pełnym $p=0,00115$. Zidentyfikowała również polimorfizm w obszarze promotora genu *NOS2* rs2779249. Wykazujący najsilniejszy związek z współczynnikiem RWT, który wynosił w modelu prostym $p=0,00012$ oraz $p=0,00003$ w modelu pełnym, dla całej grupy badanej. Analiza anotacji polimorfizmów przeprowadzona przez Doktorantkę wykazała ą SNP rs2779249 zlokalizowany w pozycji -1026 promotora genu *NOS2* jest miejscem wiązania czynników transkrypcyjnych. I w zależności od allelu wiąże inny kompleks białek np. dla allelu A wiąże czynniki transkrypcyjne AP1, NF1, SP1.

Podsumowując tę część pracy chciałbym podkreślić, że wszystkie użyte metody charakteryzują wysoki stopień obiektywizacji danych, a wykorzystane analizy statystyczne nie budzą zastrzeżeń. Przekonuje ona, że wszystkie doświadczenia przeprowadzone zostały ze skrupulatnością i obejmuje założone aspekty prowadzonych badań. Sposób ich prezentacji jest przemyślany, co pozwala śledzić postępy pracy i rejestrować realizację jej kolejnych celów i zadań.

W części Dyskusja Doktorantka przedyskutowała otrzymane wyniki. Konfrontując je z licznymi badaniami przeprowadzonymi na różnych populacjach. Jednakże trudno je jednoznacznie porównać gdyż większość diskutowanych danych nie została zweryfikowana pomiędzy populacjami oraz nie wyjaśniono również mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za związek danego polimorfizmu z przerostem lewej komory serca. Przyczyną tych niepowodzeń najprawdopodobniej jest zbyt małe grupy badawcze, nie pozwalających na uzyskanie odpowiedniej mocy statystycznej. Choroby współwystępujące np. nadciśnienie tętnicze, nieprecyzyjny dobór locus genowych i/lub polimorfizmów znacznikowych.

W przypadku Doktorantki próbą pokonania wyżej opisanych trudności było zdefiniowanie unikalnej w pełni scharakteryzowanej grupy chorych $n=657$ z ciężką postacią stenozy aortalnej. W grupie tej zdefiniowano polimorfizm rs2779249 (C/A) w obszarze promotora genu *NOS2*. Stwierdzają jego związek z wyższymi wartościami współczynnika względnej grubości ścian lewej komory serca,



zarówno w modelu genetycznym prostym jak i pełnym w całej grupie chorych, a efekt ten był najsilniejszy dla grupy mężczyzn.

W dalszej części dyskusji, Doktorantka przedstawia prawdopodobne powiązanie identyfikowanych polimorficznych loci z przerostem lewej komory serca jak też dyskutuje na temat powiązania powyższych z innymi jednostkami chorobowymi i doniesieniami literaturowymi opisującymi powyższe. Przedstawia dane na temat polimorfizmów funkcjonalnych NOS2 których znaczenie do dziś pozostaje niewyjaśnione, co przy obecnym stanie wiedzy jest nie do końca jasne. Przedstawia dane i dyskutuje również mnogość publikacji opisujących polimorficzne loci identyfikowane w obszarze promotora genu NOS2, braku ich funkcjonalnych badań i określenia powiązania np. z potencjalnymi miejscami wiązania czynników transkrypcyjnych. Doktorantka stara się również wytłumaczyć, powiązać funkcjonalnie zidentyfikowany polimorfizm rs2779249 w miejscu wiązania czynników transkrypcyjnych, określając jego znaczenie w procesie transkrypcji genu *NOS2*. I wyznaczyć potencjalny szlak sygnałowy procesu transkrypcji *NOS2* kodowanego białka iNOS w układzie sercowo-naczyniowym mogącego prowadzić do przerostu lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej. Swoje przemyślenia przedstawia na rycinie 5, dość przekonująco tłumacząc poszczególne etapy rozwoju choroby.

Skomplikowalność powyższych powiązań, ich powiązanie genetyczno-funkcjonalne na poziomie komórki świadczy o dużej wiedzy Doktorantki i dojrzałości w przemyśleniu tematu. A jej rzetelność i zaangażowanie znalazło odbicie w mnogości narzędzi biologii molekularnej i bioinformatyki użytych w powyższej rozprawie doktorskiej.

Wyrazem powyższych są dwa precyzyjne i w pełni zasadne wnioski zaproponowane przez Doktorantkę podsumowujące powyższą pracę. Wnioski te są jednocześnie dowodem na zrealizowanie w pełni przez Doktoranta celów jego dysertacji.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem uważam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Eweliny Zakościelnej pod każdym względem spełnia wymogi stawiane takim dysertacjom. Stanowi ona samodzielne i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wnosi nowe, ważne poznawczo dane na temat związku genu indukowanej syntazy tlenu azotu NOS2 z przerostem lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej.





Przygotowana dysertacja została w sposób właściwy, zarówno pod względem merytorycznym, jak i edycyjnym. Drobne uwagi, jakie posiadam do przedstawionej pracy są natury edytorskiej. Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędów stylistycznych czy natury językowej np. geny kandydaci lepiej brzmi geny kandydackie, ...osób pochodzenia kaukaskiego lepiej brzmi osób rasy kaukaskiej i kilku innych. Należy również pamiętać że nazwę genu np. *NOS2* piszemy kursywą a w wielu miejscach Doktorantka o tym zapomina. Kilka tych drobnych uchybień stylistycznych i tzw. literówek, które udało mi się zauważyć nie ma istotnego znaczenia dla jakości i rangi pracy.

Niepodważalne znaczenie dla wartości pracy – którą pod względem merytorycznym oceniam bardzo wysoko miała by kontynuacja dalszych badań i poznanie dokładnego mechanizmu molekularnego funkcji SNP rs2779249. Oraz przeprowadzenie badań funkcjonalnych, co również zaznacza w podsumowaniu Doktorantka.

Jako Recenzent mam pytanie do Doktorantki czy powyższe dane zmienności genetycznej mogą w przyszłości posłużyć do szybkiej i wczesnej predykcji choroby?? Czy może w przyszłości kiedy lepiej poznamy mechanizmy epigenetyczne, również do definiowania terapii celowanych i prewencyjnych?

W podsumowaniu uważam, że praca doktorska mgr Eweliny Zakościelnej zatytułowana „Związek genu indukowanej syntazy tlenu azotu *NOS2* z przerostem lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej.” Spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 z późn.zm.) dla rozprawy na stopień doktora, ze względu na bardzo duży walor aplikacyjny, oraz nowatorski zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie o dopuszczenie mgr Ewelinę Zakościelną do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedry Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakładu Genetyki Klinicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Maciej Borowiec

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej

92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 272 57 67
e-mail: katedra.genetyki@umed.lodz.pl
w4u.umed.lodz.pl/~genetyka



