



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

WYDZIAŁ LEKARSKI

Zakład Farmakologii

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2C

Tel. (85) 748-55-70

adam.holownia@umb.edu.pl

Prof. dr hab. Adam Hołownia

Białystok, 22.07.2022.

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

pt." ANALIZA PORÓWNAWCZA POLIMORFIZMU GENÓW *FCGR* W SARKOIDOZIE I GRUŻLICY PŁUC"

lek. Bartłomieja Rękawieckiego

z Kliniki Pneumonologii, Katedry Pneumonologii i Alergologii GUMed

Pracy doktorska lek. Bartłomieja Rękawieckiego dotyczy polimorfizmu genów *FCGR* w ziarniniakowych chorobach płuc - sarkoidozie (SA) i gruźlicy (TB). Polimorfizm to rodzaj odrębności, zmienności lub nieciągłości obserwowanej cechy, która nie jest mutacją i występuje w znaczącej frakcji określonej populacji z powtarzalną częstością. Nie jest on z reguły uchwytany w typowym w badaniu funkcji biologicznych, może jednak w pewnych okolicznościach determinować cechy jednostki, a jeśli występuje stosunkowo często, także subpopulacji. W farmakologii którą reprezentuję, funkcjonalny polimorfizm dotyczy głównie metabolizmu niektórych leków, również receptorów, a więc wpływa na efektywność farmakoterapii. Definiując a priori warunki farmakoterapii, nie bierzemy jednak pod uwagę polimorfizmu, skupiając się na efekcie klinicznym i modyfikujemy dawki, jeśli pacjent nie odpowiada na lek zgodnie z oczekiwaniami. Oceniana praca doktorska dotyczy innego rodzaju polimorfizmu. Polimorfizm genów *FCGR* jest istotny, bo jest związany z nieznanym patomechanizmem chorób ziarniniakowych. SA i TB to choroby o zróżnicowanej etiologii i przebiegu klinicznym, których wspólną cechą jest obraz morfologiczny. Pomimo wielu lat badań, związek między SA i TB pozostaje niejasny. Uważa się, że zapalenie ziarniniakowe w SA jest spowodowane przez niedegradowany antygen o charakterze zakaźnym lub niezakaźnym i wynikającą z niego reakcją gospodarza. Hipoteza „niezakaźna” nie znalazła eksperymentalnego potwierdzenia, natomiast hipoteza proponująca udział *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) pozostaje nadal prawdopodobna a dowody na udział MTB w etiologii SA są wielowątkowe. Nie bez znaczenia w tym aspekcie są badania zespołu prof. Dubaniewicz z GUMed. Postulat Kocha by nazwać SA infekcją spowodowaną MTB, nie jest

jednak nadal spełniony. Podobieństwo kliniczne sprawia, że diagnostyka różnicowa tych dwóch stanów jest trudna, a błędnie rozpoznana TB leczona jak SA może mieć katastrofalne konsekwencje.

Doktorant formułuje hipotezę, że ekspresja i profil receptorów FCGR2 i FCGR3 wpływających między innymi na fagocytozę kompleksów immunologicznych, pozwoli precyzyjnie rozpoznać cechy typowe dla SA i TB. Badania objęły niespokrewnione osoby dorosłe, obojga płci u których w wywiadzie nie stwierdzono zachorowań na SA i TB. Doktorant pobrał krew od 154 osób z histopatologicznym potwierdzeniem SA, 179 pacjentów z TB potwierdzoną bakteriologicznie i 148 zdrowych ochotników i wykonał szereg reakcji PCR. Okazało się, że zwiększone ryzyko zachorowania na SA i TB występowało u nosicieli allelu 57Q i heterozygot 57XQ genu *FCGR2C*, a zmniejszone u nosicieli allelu 57X i homozygot 57XX genu *FCGR2C*. Rozwój TB był także związany z obecnością heterozygot NA1/NA2 genu *FCGR3B*. Zmniejszone ryzyko rozwoju SA występowało z kolei u nosicieli heterozygot 158FV genu *FCGR3A*, a w TB u nosicieli allelu SH i genotypów NA2/NA2, NA1/SH genu *FCGR3B*. We wczesnych stadiach choroby występowała przewaga alleli i genotypów, kodujących mniej aktywne receptory FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIb. Liczba kopii poszczególnych genów *FCGR* nie miała związku z ryzykiem zachorowania na SA i TB oraz nie różniła się w obu grupach.

Na podstawie tych wyników doktorant stwierdza, że polimorfizm genów *FCGR2C* i *FCGR3A* u pacjentów z SA może być związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby. Uważa również, że częstsze występowanie ważnych funkcjonalnie receptorów FcγRIIc może wiązać z zwiększoną immunokompleksamią, przy jednoczesnym wzroście odsetka monocytów z FcγR oraz dysfunkcją komórek NK u tych samych chorych. Ponadto, we wczesnych stadiach choroby (I, II, I/II) przewaga alleli i genotypów, kodujących mniej funkcjonalne receptory FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIb w porównaniu z zaawansowanymi jej stadiami (III, IV, III/IV) może skutkować obniżoną fagocytozą KI/Ag i immunokompleksamią w początkowych fazach SA. Zwiększone ryzyko zachorowania na TB było z kolei związane, wg doktoranta, z obecnością polimorfizmów genów *FCGR2C* oraz *FCGR3B* i występowaniem aktywniejszych wariantów receptorów FcγRIIc i FcγRIIIb, które najprawdopodobniej zwiększają klirens KI/Ag/Mtb i powodują mniejszą immunokompleksamią. Analiza częstości występowania poszczególnych alleli i genotypów między SA i TB, a zwłaszcza w zakresie genów *FCGR3A* (genotyp 158FV) oraz *FCGR3B* (genotyp NA1/NA2), może być pomocna w różnicowaniu tych dwóch chorób. Liczba kopii poszczególnych genów *FCGR* nie miała wpływu na zwiększone ryzyko zachorowania na SA i TB oraz nie różniła się w SA i TB.

Doktorant wykonał ogromną pracę. Doktorat liczy 182 strony, 414 pozycji piśmiennictwa, uzyskane wyniki są ujęte w 24 tabelach i przedstawione na 45 rycinach. Pomimo dużego wysiłku, wnioski są stosunkowo skromne. Rodzi to pytanie nie tyle o wartość postawionej hipotezy, ale raczej o sposób jej weryfikacji. Są współcześnie metody lepsze niż PCR do badania osobniczej zmienności i profilu alleli. Praca jest pieczołowicie opisana, jednak jest pozbawiona plastyczności i ma raczej cechy diagnostyczne niż naukowe. Przyjęty schemat jest realizowany od A do Z w jednakowy sposób. Nie ma poszerzenia badań w sferach, w których wyniki są obiecujące. Nie wiemy, czy autor szukał specyficznych cech ze względu na wartość diagnostyczną, do czego PCR znakomicie się nadaje, czy w celu wyjaśnienia niejasnego przecież patomechanizmu. W tym aspekcie właściwsze byłoby badanie funkcji receptorów, a więc badanie czynnościowe białek. Istnieje obecnie możliwość badania hamowania i stymulacji tych receptorów izolowanych od pacjenta, co znacznie pogłębiłoby rozumienie związku polimorfizmu z funkcją. Celowe byłoby także przyjrzenie się, jak zachowują się badane parametry u poszczególnych pacjentów i zbadanie wzajemnych relacji pomiędzy nimi. Taka analiza wnosi o wiele więcej, niż badania „populacyjne”, nawet jeśli ta populacja jest stratyfikowana na klasy wynikające z identyfikacji rodzaju polimorfizmu. Jeśli doktorant prowadził rejestrację imienną wyników poszczególnych pacjentów, taka analiza powinna być wykonana. Jeśli nie, może to być przedmiotem dalszych badań.

Oprócz uwag o charakterze ogólnym, mam również kilka spostrzeżeń „technicznych”.

1. Doktorant w całej pracy operuje wartościami frakcyjnymi. Zmienność w podgrupach nie jest przedstawiona, również nie ma jej na rycinach i w tabelach.
2. We wnioskach doktorant wychodzi poza wyniki własne (np. immunokompleksemia), co ma cechy spekulacji.
2. Doktorant często używa wyrażenia „pacjenci z Polski północnej”. Czyżby w tym zakresie istniała heterogenność?
3. Równie często, odnośnie już opublikowanych wyników pada określenie „wykazany”, np. „polimorfizm”. Wyniku żadnego badania eksperymentalnego nie można interpretować w kategoriach ostatecznych. To raczej doraźna propozycja i tak należy ją traktować.
4. Doktorant wiele razy pisze „receptory ulegają ekspresji”. Właściwsze jest określenie „gęstość receptorów”, a jeśli piszemy „ekspresja receptorów” – to może być ona zmniejszona lub zwiększona w stosunku do stanu poprzedniego, co zawsze warto ocenić.

5. Cel pracy nie jest dobrze napisany. Cel badań powinien kształtować się we „Wstępie”, by w sekcji „Cel pracy” przyjąć formę 1-2 zdań, bez odnośników literaturowych i dodatkowych argumentów.

Powyższe uwagi nie są jednak kluczowe. Praca doktorska jest dobrze zaplanowana i wykonana, co świadczy o dobrej organizacji pracy laboratoryjnej i dojrzałości naukowej doktoranta, dlatego z przekonaniem stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora zgodnie z art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021r. pozycja 478 ze zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Medycznych GUMed o dopuszczenie lek. Bartłomieja Rękawieckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok, dnia 22.07.2022 r.

KURATORNIK
ZAKŁADU FARMAKOLOGII

prof. Adam Holownia