Prof. dr hab.n.med. Marek Dąbrowski
Klinika Kardiologii Oddziału Fizjoterapii II WL
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Szpital Bielański im. Ks. J. Popiełuszki
01-809 Warszawa, ul. Cegłowska 80

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Karoliny Kryczki pt. „Związek polimorfizmu insercja/delecja genu konwertazy angiotensyny z występowaniem i zaawansowaniem przedwczesnej miażdżycy tętnic wieńcowych".

Układ renina–angiotensyna–aldosteron (RAA) na wielu poziomach warunkuje funkcjonowanie układu krążenia. Jest jednocześnie znaczący dla prawidłowego funkcjonowania śródbłonka naczyń. Miażdżyca jest chorobą zapalną naczyń, która rozwijaj się na podłożu zaburzeń jego funkcji. Dotychczas przeprowadzone badania genetyczne zidentyfikowały szereg polimorfizmów genów warunkujących zmiany aktywności różnych składowych układu RAA. Wykazano też wpływ tych polimorfizmów, bezpośredni lub pośredni, na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego jako całości, a wybiórczo na funkcjonowanie śródbłonka naczyniowego jako integralnej składowej tego układu.

Jednym z ważniejszych elementów badań nad podłożem genetycznym zmian układu RAA są badania dotyczące polimorfizmu genu odpowiedzialnego za syntezę enzymu konwertującego angiotensynę I do angiotensyny II (ACE). Należy on jak wiadomo do najważniejszych patofizjologicznie enzymów układu RAA warunkujących ilość angiotensyny II, bradykininy, aldosteronu. Na podstawie dotychczasowych badań wiadomo, że jednym z mechanizmów warunkujących aktywność ACE są polimorfizmy genu odpowiedzialnego za syntezę tego enzymu, a głównym z nich jest polimorfizm insercja/delecja (I/D).

Wykazano także, że średnia aktywność ACE jest dwa razy wyższa w przypadku genotypu DD niż II, a genotyp ID wykazuje pośrednią aktywność tego enzymu.

W piśmiennictwie znajduje się wiele prac wskazujących na związek polimorfizmu genu ACE z nadciśnieniem tętniczym, ryzykiem zawału mięśnia sercowego, udarem mózgu, rozległością zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych.

Autorka recenzowanego opracowania postanowiła poszukać podobnego związku z przedwczesną miażdżycą występującą zarówno u kobiet do 55 roku życia i mężczyzn do 45 roku życia rozpoznaną na podstawie koronarografii.
Podjęty temat jest ważny zarówno z naukowego – nie są dotychczas znane wyniki opisanego związku w tak zdefiniowanej grupie – oraz klinicznego punktu widzenia – ponieważ na aktywność ACE i innych składowych układu RAA można wpływać farmakologicznie.
Zakres przeprowadzonych badań i dociekliwość doktorantki znacznie przekroczyły tytułowe sformułowanie badanego zagadnienia.

Opis pracy

Recenzowane praca ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań.
41 stron wstępu – ok. 45% całości w pierwszej chwili wydaje się zaburzać proporcje zwyczajowo przyjęte dla podobnych opracowań. Jednak wielowątkowość prowadzonych przez doktorantkę badań usprawiedliwia tak obszerne wprowadzenie. Szczególnie dotyczy to omówienia mechanizmów dotyczących polimorfizmów w ludzkim genomie mogących powodować wzrost ryzyka chorób sercowo-naczyniowych ze szczególnie dokładnie omówionymi polimorfizmami genów wpływających na układ renina–angiotensyna–aldosteron.
Doktorantka powołuje się jednocześnie na zbadane już polimorfizmy dotyczące tego układu i ryzyko występowania chorób sercowo-naczyniowych, w tym szczególnie związanych z dysfunkcją śródbłonka naczyniowego i zapaleniem tętnic prowadzącym do zmian miażdżycowych.
Autorka wykazuje się w tej części erudycją i znakomitą znajomością piśmiennictwa bogato cytowanego i wykorzystanego.
Przyznaję, że bez tak szczegółowego wprowadzenia trudno byłoby zrozumieć celowość szczegółowych kierunków zaplanowanych przez doktorantkę badań. Dotyczy to szczególnie synergistycznego wpływu polimorfizmów różnych genów, które mogą powodować wzrosty ryzyka występowania chorób sercowo-naczyniowych, wpływać na klasyczne czynniki ryzyka miażdżycy i być zależne od płci.
Autorka formułuje 5 celów pracy. Głównym celem jest poszukiwanie związku polimorfizmu insercja/delecja genu ACE z występowaniem i stopniem zaawansowania przedwczesnej miażdżycy tętnic. Ponadto badaczka spodziewa się wpływu płci na

powyższe zależności oraz zamierza badać związek wspomnianego polimorfizmu ze stężeniem fibrynogenu i przedwczesną miażdżycą oraz klasycznymi czynnikami ryzyka z przedwczesną miażdżycą.

Wspomniane trzy ostatnie cele logicznie wynikają z niejasności pojawiających się w piśmiennictwie przywołanym we wstępie. Konsekwencją powyższych jasno sprecyzowanych celów jest pięć grup hipotez badawczych.

W części poświęconej metodyce autorka omawia szczegółowo kryteria włączenia do badanej grupy 407 pacjentów.

Ponieważ w pojedynczych wcześniejszych pracach wykazano związek polimorfizmu I/D genu ACE z nieprawidłowościami dotyczącymi układu krzepnięcia, a znany jest także związek fibrynogenu z procesami zapalnymi, w tym zawałem serca, doktorantka postanowiła zbadać także współistnienie takiej zależności w swojej pracy.

Mimo, że fibrynogen jest znanym markerem stanu zapalnego, nie wiadomo dotychczas, czy jest jedynie jego odzwierciedleniem, czy niezależnym czynnikiem patogenetycznym.

Związek interakcji polimorfizmu I/D genu ACE z genami kodującymi białka spoza układu ACE wykazano dotychczas w populacji chińskiej w postaci wpływu na częstość występowania niedokrwiennego udaru mózgu. Jednak badanie nie wyjaśniło mechanizmu opisanego związku. Ponieważ opisana interakcja dotyczy genu odpowiedzialnego za produkcję β -fibrynogenu, a w cytowanym badaniu nie oznaczano fibrynogenu, doktorantka słusznie postanowiła sprawdzić to „brakujące ogniwo" w kontekście wczesnej miażdżycy.

Trzecim zagadnieniem objętym badaniem było zagadnienie interakcji genotypu DD z uznanymi czynnikami ryzyka rozwoju miażdżycy. Ten aspekt pracy nie wymaga szerszego uzasadnienia i wydaje się oczywisty.

Niejasności budzi dobór dwóch grup kontrolnych. Ponieważ od postawienia rozpoznania choroby niedokrwiennej serca do wykonania koronarografii potwierdzającej to rozpoznanie w grupie badanej minął średnio rok, doktorantka postanowiła dobrać dwie grupy kontrolne odpowiadające wiekowo tym dwóm etapom rozpoznania choroby niedokrwiennej. Analogicznie do grupy badanej, grupy te różnią się wiekiem oraz w niewielkim stopniu częstością występowania klasycznych czynników ryzyka choroby niedokrwiennej.

Wyniki badań

Na podstawie przeprowadzonych badań doktorantka wykazała związek genotypu DD z występowaniem, rozległością i stopniem zaawansowania wczesnych zmian miażdżycowych szczególnie w grupie mężczyzn. Dla grupy kobiet zależność tę wykazała także dla zwężeń ≥ 90% w 2-3 tętnicach lub pnia lewej tętnicy wieńcowej . Wykazała ponadto, że związek z genotypem DD był niezależny od uznanych czynników ryzyka miażdżycy. Wykazana przez doktorantkę zależność genotypu DD z występowaniem wczesnej miażdżycy dotyczy przede wszystkim mężczyzn. Koresponduje to z wcześniej stwierdzonym, a opisanym na wstępie pracy synergizmem polimorfizmu DD genu dla ACE i czynnikiem transkrypcyjnym kodowanym przez gen znajdujący się w chromosomie Y, co tłumaczy wyższy poziom reniny u mężczyzn.

Bardzo silnym atutem pracy jest seria badań związku polimorfizmu DD genu ACE z poziomem fibrynogenu. Doktorantka wykazała taki związek u kobiet, szczególnie z chorobą wieńcową rozpoznaną de novo i po przebytym OZW.

Ponadto wykazała, że palenie tytoniu i nadciśnienie tętnicze dodatkowo zwiększa ryzyko wzrostu poziomu fibrynogenu powyżej mediany. Zależności takiej nie wykazano w grupie mężczyzn.

Kolejnym badanym wątkiem była interakcja polimorfizmu DD z uznanymi czynnikami ryzyka choroby wieńcowej. Doktorantka wykazała niezależny od płci związek przedwczesnej choroby niedokrwiennej serca z nadciśnieniem tętniczym w grupie z polimorfizmem DD genu ACE. Była to jedyna synergia polimorfizmu DD z tradycyjnym czynnikiem ryzyka w grupie mężczyzn. U kobiet dodatkowo stwierdzono synergizm polimorfizmu DD z wywiadem rodzinnym choroby niedokrwiennej, hiperlipemią i otyłością.

W kolejnym rozdziale, dyskusji, autorka wykazuje się znakomitą znajomością piśmiennictwa. Omawiając poszczególne fragmenty swoich badań podkreśla, że są one po raz pierwszy przeprowadzone w tak szerokim zakresie w grupie względnie młodych chorych z koronarograficznie potwierdzoną miażdżycą tętnic wieńcowych. Autorka w tej części omawia także krytycznie inne prace badające związek polimorfizmu I/D z chorobą niedokrwienną serca, wskazując na pewne błędy logiczne lub nieścisłości.

Pracę podsumowuje pięć adekwatnych wniosków.

Uwagi krytyczne

Najsłabszym ogniwem pracy jest sposób doboru grupy kontrolnej, a właściwie dwóch grup kontrolnych. Kryterium doboru grupy badanej był w pierwszym etapie wywiad wskazujący na chorobę niedokrwienną – do tak sformatowanej grupy została dobrana grupa kontrolna i głównym kryterium doboru był wywiad wskazujący na brak cech charakterystycznych dla choroby niedokrwiennej serca.

Jednakże ostatecznym i szczególnie wartościowym elementem w grupie badanej było wykonanie koronarografii potwierdzającej obecność zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych. Ponieważ od rozpoznania choroby wieńcowej do wykonania koronarografii upłynęło śr. 1,2 roku doktorantka dobrała ponownie grupę kontrolną opowiadającą grupie badanej pod względem wieku i płci w momencie wykonania koronarografii. Również tym razem głównym kryterium był brak charakterystycznego dla choroby wieńcowej wywiadu.

Ostatecznie więc zastosowano dwa różne kryteria doboru – w grupie badanej kryterium była miażdżyca tętnic wieńcowych potwierdzona koronarograficznie w obydwu grupach kontrolnych jedynie ujemny dla choroby wywiad. Można więc tu jedynie mówić o prawdopodobieństwie braku istotnych zmian w tętnicach wieńcowych. Sytuację niekompatybilności grup może jeszcze pogorszyć kryterium przyjęte przez doktorantkę zwężeń w zakresie 50-70% światła tętnic.

Zakres ten może powodować całkowicie bezobjawowy przebieg kliniczny i trudno znaleźć argument wykluczający obecność takich osób w grupach kontrolnych.

Trafniejszy wg recenzenta byłby dobór grupy kontrolnej spośród osób z prawidłową koronarografią, nawet wykonaną techniką nieinwazyjną.

Pomimo woli zrozumienia intencji doktorantki wykazania się rzetelnością badacza trudno recenzentowi zaakceptować rozumowanie, które doprowadziło do utworzenia drugiej grupy kontrolnej. Przesunięcie wiekowe o 1,2 roku nie spowodowało żadnej istotności statystycznej, a wyniki analizy są umieszczone w suplemencie i w pracy zasadniczej są praktycznie nie wykorzystane. Tworzą oddzielną, niejako równoległą do wątku zasadniczego pracę. Przyjęta koncepcja burzy proste przedstawienie materiału badawczego, niepotrzebnie komplikuje prezentację w rozdziale zatytułowanym „metodyka" i zmusza czytelnika do poszukiwań rzeczywistych intencji autorki.

Reasumując

Doktorantka wykazała związek genotypu DD z występowaniem przedwczesnej miażdżycy tętnic wieńcowych oraz stopniem zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych – potwierdzając w tym zakresie wcześniejsze wyniki nielicznych prac.
Ponadto jako pierwsza wykazała zależną od płci różnicę związku genotypu DD z nasileniem zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych.
Również po raz pierwszy wykazała związek stężenia fibrynogenu z genotypem DD u kobiet z przedwczesną chorobą niedokrwienną serca oraz potwierdziła znaczenie podwyższonego poziomu fibrynogenu jako czynnika ryzyka wystąpienia OZW, mimo że związek z genotypem DD potwierdziła jedynie u kobiet.
Stwierdziła także, że interakcja genotypu DD z większą liczbą uznanych czynników ryzyka miażdżycy dotyczy częściej kobiet niż mężczyzn.
Wykazując powyższe wniosła swoją pracą istotny wkład do wiedzy dotyczącej badanego zagadnienia.
Realizując założony program badawczy wykazała się wiedzą, rzetelnością, drobiazgową dokładnością i pasją badacza, umiejętnością analizowania wyników prowadzonych badań i formułowania wniosków.
W związku z tym wnoszę do wysokiej Rady Instytutu Kardiologii im. Prymasa Tysiąclecia Stefana Kardynała Wyszyńskiego o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab.n.med. Marek Dąbrowski

Warszawa
14.09.2016.