

prof. dr hab. Cezary Żekanowski  
Kierownik Pracowni Neurogenetyki  
Zespół Kliniczno-Badawczy Chorób Zwyczajnych CUN  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

7 grudnia 2014 r.

### **Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Mateusza Adamskiego "Wybrane aspekty genetyki udaru mózgu"**

Pomimo znaczącego postępu w zapobieganiu i leczeniu udaru mózgu, pozostaje on trzecią najczęstszą przyczyną śmierci w skali świata, a także znaczącym czynnikiem powodującym niepełnosprawność i upośledzenie poznawcze. W Polsce udar dotyka co roku ponad 60.000 osób. Ze wszystkich udarów mózgu zdecydowaną większość stanowią udary niedokrwienne (prawie 90%). W około 10% przypadków przyczyną jest krwotok śródmózgowy, a w pozostałych krwotok podpajęczynówkowy. Badania mające na celu poznanie podłoża genetycznego związanego z ryzykiem wystąpienia udaru mózgu mają znaczenie dwojakie. Po pierwsze jako strategia odkrywania zaś nowych patomechanizmów rozwoju choroby naczyniowo-mózgowej. Odkrycie nowych białek i szlaków biochemicznych może przyczynić się do powstania celowanych strategii leczniczych. Z drugiej strony, wykrycie markerów genetycznych charakterystycznych dla pacjentów, umożliwi opracowanie presymptomatycznych testów genetycznych, identyfikujących grupy ryzyka. Określenie wariantów genetycznych związanych np. z odpowiedzią na leki czy przewidywanym przebiegiem choroby otworzy możliwość indywidualizacji leczenia.

Liczba powszechnie występujących (*common*) wariantów genetycznych związanych w sposób potwierdzony w różnych populacjach z ryzykiem udaru mózgu zwiększa się z każdym rokiem. Choć wpływ poszczególnych wariantów i ich kombinacji jest niewielki, znaczenie populacyjne wspomnianych wariantów znacznie przewyższa wpływ nielicznych mutacji powodujących rodzinne zespoły, w których występuje udar mózgu.

Oczekuje się, że badania asocjacyjne w skali całego genomu, ale także zastosowanie technik sekwencjonowania nowej generacji (np. WES, WGS) doprowadzą do wykrycia nowych *loci*, związanych zarówno w sposób statystyczny, jak i przyczynowy z różnego typu udarami mózgu. Duża rola przypada międzynarodowym inicjatywom, zrzeszającym genetyków i klinicystów zajmujących się udarami mózgu, np. International Stroke Genetics Consortium (z jego inicjatywą METASTROKE Collaboration) czy Stroke Genetics Network (SiGN, sieć prowadzoną przez National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NINDS), dzięki którym możliwe jest prowadzenie badań na reprezentatywnych grupach chorych.

Dla badań genetycznych istotne znaczenie ma klasyfikacja udarów na podstawie istniejącej wiedzy o przypuszczalnych mechanizmach choroby. System klasyfikacji TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment), stosowany głównie w przypadkach niedokrwiennego udaru mózgu wyróżnia udar dużych naczyń krwionośnych (LVD), małych naczyń krwionośnych (SVD), udar sercowo-zatorowy (CES), a także inne oraz nierozpoznane przyczyny. Badania genetyczne wskazujące, że konkretne warianty genetyczne związane są z określonymi podtypami udaru potwierdziły przypuszczenia neurologów, że udar mózgu jest zespołem, kontinuum

objawów, a nie pojedynczym schorzeniem. Zastosowane narzędzi genetyki molekularnej może w przyszłości umożliwić opracowanie ujednoliconego systemu klasyfikacji, uwzględniającego dane kliniczne, neuroobrazowe i genetyczne pacjentów.

Badanie wpływu czynników genetycznych na ryzyko udaru mózgu jest zadaniem trudnym, co wynika zarówno z metodologicznych ograniczeń badań asocjacyjnych (wymagających dużych, dobrze scharakteryzowanych klinicznie grup badanych i kontrolnych), jak ze złożoności fenotypowej choroby oraz skomplikowanej patogenezы, w tym udziału szeregu wzajemnie oddziałujących białek, uczestniczących np. w procesach agregacji płytek krwi.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. med. Mateusza Adamskiego "Wybrane aspekty genetyki udaru mózgu" obejmuje przeprowadzone przez Autora badania genetyczne zmierzające do określenia związku polimorfizmu wybranych genów z ryzykiem udaru mózgu w populacji polskiej. Wybór bardzo aktualnego tematu pracy przez Doktoranta należy ocenić wysoko, jako zasadny naukowo i pożądany ze względu na możliwość przeniesienia uzyskanych wyników do praktyki klinicznej.

Rozprawa jest zbiorem trzech artykułów oryginalnych oraz jednego przeglądowego (rozdziału w podręczniku genetyki medycznej). Zostały one opatrzone spisem treści, streszczeniem (w języku polskim i angielskim), wstępem, zwięzłym określeniem celów badań, a także krótkim podsumowaniem każdego z wspomnianych artykułów (z podaniem przedmiotu analizy, struktury grupy badanej i kontrolnej, stosowanych metod oraz uzyskanych wyników). Wszystkie artykuły dotyczą podłoża genetycznego udaru mózgu. Spełnione zostały tym samym ustawowe wymogi odnośnie spójności tematycznej publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Wszystkie artykuły oryginalne są pracami wieloautorskimi, opublikowanymi w czasopismach z Listy Filadelfijskiej (*Acta Neurologica Scandinavica*, *BBRC* oraz *Neurochirurgia i Neurologia Polska*). Łącznie prace były cytowane 12 razy, a indeks Hirscha dla wspomnianych prac wynosi 2. Do rozprawy dołączone są oświadczenia wszystkich współautorów, wskazujące na indywidualny wkład Doktoranta przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników poszczególnych prac. Należy zwrócić uwagę, że we wszystkich publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym.

Krótki wstęp podsumowuje kliniczne i epidemiologiczne aspekty badanej jednostki chorobowej oraz zasady analiz genetycznych, odsyłając do publikacji przeglądowej, wchodzącej w skład ocenianej rozprawy.

Głównym celem pracy było określenie związku wybranych polimorfizmów trzech genów kandydujących, będących prawdopodobnymi czynnikami ryzyka różnego typu udaru mózgu. Wszystkie badania miały charakter analizy *case-control* i dotyczyły konkretnych genów kandydujących, wybranych albo na podstawie istniejącej wiedzy, albo badanych już w kontekście chorób sercowo-naczyniowych czy udaru mózgu. Szczegółowe cele obejmowały określenie związku z fenotypem choroby następujących wariantów: 1. trzech polimorfizmów (-844G/A, HindIII G/C, -6754 G/5G) genu kodującego inhibitor aktywatora plazminogenu typu I (*PAI-1*); 2. polimorfizmu P1A1/A2 genu kodującego glikoproteinę IIIa (*GpIIIa*); oraz 3. polimorfizmu A1166C genu receptora angiotensyny II typu 1 (*AGTR1*). W przypadku polimorfizmów genu *PAI-1* badano związek z trzema typami udaru (dużych i małych

naczyń oraz sercowo-zatorowego), dla polimorfizmu PIA1/A2 z krwotokiem podpajęczynówkowym oraz związek polimorfizmu *AGTR1* ogólnie z udarem krwotocznym mózgu. Celem rozprawy było także podsumowanie aktualnego stanu wiedzy o wpływie podłoża genetycznego na różnego typu udary mózgu.

Najważniejszą częścią rozprawy są trzy artykuły przedstawiający wyniki badań asocjacyjnych pomiędzy fenotypem klinicznym udaru mózgu i wybranymi wariantami genów *PAI-I*, *GpIIIa* oraz *AGTR1*.

W pierwszej pracy Doktorant zgromadził grupę 390 pacjentów z udarem niedokrwiennym, z czego u 117 osób w przebiegu choroby dużych naczyń, u 121 osób w przebiegu choroby małych naczyń oraz 152 z udarem sercowo-zatorowym. Grupa kontrolna liczyła 291 osób, zgodnych pod względem płci i wieku. W tej grupie nie wykluczono jednak wszystkich schorzeń kardiologicznych mogących wpływać na ryzyko udaru. Do genotypowania trzech polimorfizmów promotorowych genu *PAI-I* Doktorant użył techniki RFLP oraz SSCA, a do oceny wyników liczbowych zastosował poprawną metodologię statystyczną (m.in. analizę jednozmienną, regresję logistyczną przy założeniu modeli dominującego, recesywnego i addytywnego). Potwierdził także wysoki stopień sprzężenia pomiędzy badanymi wariantami, zidentyfikował bloki haplotypów naokoło *PAI-I*, a następnie zbadał związek konkretnych haplotypów trzech badanych polimorfizmów z typami udaru. Na poziomie alleli i genotypów Doktorant nie stwierdził istotnych statystycznie różnic częstości pomiędzy osobami chorymi, a kontrolami. Badając jednak haplotypy utworzone przez wspomniane polimorfizmy wykrył, iż haplotyp A-G-4G występował istotnie częściej wśród pacjentów z udarem w przebiegu choroby małych naczyń ( $p=0,02$ ) w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Inne haplotypy występowały ze zbyt małą częstością, by można było wyciągać uprawnione wnioski. Uzyskane wyniki, wymagają rzecz jasna potwierdzenia na dużo większych grupach pacjentów i kontroli, a zwłaszcza liczniejszych grup pacjentów z konkretnymi typami udaru, a także w populacji ogólnej. Ciekawe byłoby także przeprowadzenie badań typu *cross-sectional*, gdzie porównano by pacjentów posiadający haplotyp A-G-4G z pacjentami o tym samym typie udaru nie niosących wspomnianego haplotypu. Niewątpliwie jednak zaprezentowane przez Doktoranta wyniki stanowią cenną wskazówkę dla dalszych badań.

W drugiej pracy Doktorant skoncentrował się na określeniu związku polimorfizmu PIA1/A2 genu *GpIIIa*, z jednym z fenotypów klinicznych udaru (powodowanym krwotokiem podpajęczynówkowym). Wspomniany gen koduje glikoproteinę IIIa (która wraz z glikoproteiną IIb tworzy receptor fibrynogenu, istotny czynnik regulujący agregację płytek krwi i tworzenie stabilnych skrzepów po uszkodzeniu naczyń krwionośnych. Polimorfizm PIA1/A2 (leu/pro) *GPIIIa* wiązany był z ryzykiem udaru mózgu, a najnowsza metaanaliza (2014, o pięć lat późniejsza od omawianej publikacji Doktoranta) wskazuje, że posiadanie wariantu PIA2 jest rzeczywistym czynnikiem ryzyka udaru, zwłaszcza w przebiegu choroby dużych naczyń oraz udaru sercowo-zatorowego.

Grupa badana analizowana przez Doktoranta obejmowała 288 pacjentów, a kontrolna 457 osób zdrowych, zgodnych pod względem wieku i płci z grupą badaną. Polimorfizm oznaczono metodą RFLP. Analiza statystyczna wykonana została zasadniczo tak, jak poprzednio, z tym że analiza wieloczynnikowa (regresja logistyczna) przeprowadzona została jedynie dla podgrup 191 pacjentów i 347 kontroli, dla których zgromadzono pełne dane dotyczące zmiennych mierzalnych. W rezultacie badań Autor nie stwierdził istotnych różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów badanego polimorfizmu. W analizie wieloczynnikowej

jedynie płeć, nadciśnienie tętnicze oraz palenie papierosów były niezależnymi czynnikami ryzyka choroby. Zaprezentowane przez Doktoranta badania wskazały, iż polimorfizm A1/A2 nie jest związany w grupie badanej ze zwiększonym ryzykiem krwotoku podpajęczynówkowego.

Trzecia praca dotyczy analizy asocjacji polimorfizm A1166C genu receptora angiotensyny II typu 1 (*AGTR1*) z dwoma fenotypami udaru mózgu: pierwotnym krwotoku śródmózgowym (PICH) i krwotoku podpajęczynówkowym spowodowanym pęknięciem tętniaka wewnątrzczaszkowego (aSAH). Grupa badana obejmowała 261 pacjentów PICH oraz 392 pacjentów z aSAH, a grupa kontrolna składała się z 425 zdrowych osób, zgodnych pod względem płci z grupami badanymi. Polimorfizm A1166C oznaczano metodą ARMS-PCR, wymagającą (o ile mnie pamięć nie myli) dobrej optymalizacji, niemniej metodą nadal stosowaną.

Pomimo pewnych wątpliwości dotyczących metodologii i konstrukcji grup badanych, które są zresztą w dużej części wymienione w dyskusji omawianego artykułu, uzyskane wyniki są interesujące. Doktorant nie stwierdził co prawda istotnej różnicy w częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli badanego polimorfizmu, ani pomiędzy PICH i kontrolami, ani pomiędzy aSAH a kontrolami, to wykazał, że w grupie pacjentów aSAH genotyp AA jest związany z lepszym rokowaniem klinicznym ( $p < 0,02$ ). Jest to bardzo interesująca obserwacja, wskazująca na potencjalne zastosowanie diagnostyki genetycznej, jako jednego z pomocniczych narzędzi w procesie terapeutycznym chorych z jednym z typów udaru mózgu. Oczywiście, przed translacją wspomnianego wyniku w dziedzinę praktyki, konieczne jest prowadzenie badań replikacyjnych, na dużo większych grupach pacjentów z aSAH (i innymi typami udaru) nie tylko w populacji polskiej.

W części polskojęzycznej rozprawy znajdują się trochę skrótów myślowych, literówek, a tekst nie został całkowicie wyczyszczony z żargonu laboratoryjnego - nie wpływa to oczywiście w żaden sposób na wysoką ocenę rozprawy. Wydaje się, że kolejne publikacje (J Biomol Screen, 2013; Genomics, 2014; PlosOne, 2014) dobrze pokazują dalekosiężne plany Doktoranta, świadomego wszystkich ograniczeń prostych badań asocjacyjnych, zmierzające do wykrywania markerów udaru mózgu poprzez badanie transkryptomu i proteomu, z zastosowaniem metod wysokoprzepustowych.

Podsumowując: stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia wszelkie wymogi formalne stawiane pracom na tytuł doktora nauk medycznych. **W związku z powyższym zgłaszam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie lek. med. Mateusza Adamskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



**IMDiK PAN**  
Zespół Kliniczno-Badawczy  
Chorób Zwyrodnieniowych CUN  
02-106 Warszawa, ul. A. Pawińskiego 5  
tel. 22 608-65-38, 22 608-64-85