

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpł. dnia	31-08-2023
L. dz. RN-BM/	1505

Uniwersytet Medyczny
we Wrocławiu



RPW/15092/2023 P
Data: 2023-08-31

Zielona Góra, dn. 27.08.2023r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej

lek. Michała Błocha

pt.: „Rola czynników epigenetycznych w etiopatogenezie atrezji przełyku”

Zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o powołaniu mnie na recenzenta wyżej wymienionej rozprawy doktorskiej mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Oceny dokonano na podstawie przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej w formie monografii. Recenzowany materiał analizowano w zakresie oceny układu rozprawy, celu pracy kandydata, zastosowanego w pracy piśmiennictwa, metod badawczych, omówienia wyników badań, oceny czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz czy praca prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Wrodzone zarośnięcie przełyku stanowi najczęstszą wadę wrodzoną przełyku oraz najczęstszą atrezię przewodu pokarmowego. Powstaje w skutek pierwotnego zaburzenia procesu tworzenia, i różnicowania tchawicy i przełyku z jelita przedniego na wczesnym etapie embriogenezy. Pomimo szybkiego rozwoju technik operacyjnych takich jak torakoskopia oraz zdecydowanego wzrostu przeżywalności dzieci z tą wadą szacowanego na poziomie około 90-95% w krajach wysokorozwiniętych, przyczyna zarośnięcia przełyku, w tym postaci izolowanej pozostaje nadal nieznana. Wobec powyższego należy uznać, że Doktorant podejmuje w swojej dysertacji istotny, ciekawy oraz aktualny temat.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska stanowi oprawiony maszynopis liczący 92 strony, w tym 73 strony stanowi tekst właściwy ze spisem treści i wykazem skrótów, 4 zajmuje spis rycin i tabel, 12 spis piśmiennictwa oraz 3 opinie komisji bioetycznej, dorobek naukowy autora oraz opis życiorysu. Dokumentacja w tekście właściwym obejmuje 20 rycin, 5 tabel. Obowiązkiem

recenzenta jest zauważyć mały błąd, że spis rycin w spisie treści znajduje się na stronie 73, a w rzeczywistości na 75.

Piśmiennictwo jest aktualne i złożone jest ze 170 pozycji, głównie zagranicznych, jedynie 5 pozycji (2,9%) prezentuje dorobek rodzimy. Biorąc pod uwagę część edycyjną monografii należy podkreślić jej bardzo dobrą formę oraz czytelną oprawę graficzną.

Dysertacja ma charakter monografii. W rozdziale zatytułowanym „Wstęp” Doktorant szczegółowo i precyzyjnie opisuje anatomię, histologię oraz embriologię przełyku. Przedstawia klasyfikację wg. Klutha, a także historię leczenia tej wady. W kolejnych rozdziałach omawiane są odpowiednio epidemiologia, patomechanizm wrodzonego zarośnięcia przełyku, dodatkowe wady towarzyszące. Największą uwagę doktorant poświęca roli czynników genetycznych ze szczegółowym przedstawieniem genów, których mutacje z dużym prawdopodobieństwem związane są z zaburzeniami różnicowania tchawicy i przełyku. Należy docenić bardzo starannie i wyczerpująco przedstawioną część teoretyczną dysertacji.

Cele pracy zostały odpowiednio określone, są jasne i precyzyjne:

Poszerzenie wiedzy o etiologii atrezji przełyku poprzez zbadanie genomowych profili metylacji DNA, porównanie jakościowe i ilościowe stopnia metylacji całego genomu oraz poszczególnych genów w tkankach pobranych od bliźniąt. Określenie różnic w profilu metylacji genów opisywanych jako mogące odpowiadać za AE oraz wskazanie szlaków sygnałowych, których funkcjonowanie może być zaburzone w wyniku zróżnicowania wzoru metylacji w grupie badanej.

Dodatkowo jako szczegółowe cele pracy określono:

1. Ocena przydatności techniki RRBS w badaniach nad przyczyną występowania rzadkich wrodzonych wad izolowanych o nieustalonej dotychczas etiologii na przykładzie AE.
2. Zwrócenie uwagi na zróżnicowanie tkankowe i narządowe wzoru metylacji jako możliwym kierunkiem badań w poszukiwaniu etiologii występowania wad wrodzonych.
3. Poszerzenie wiedzy na temat czynników epigenetycznych pod postacią zmienności wzoru metylacji jako przyczyny występowania wad wrodzonych na przykładzie EA.

Badaną grupę stanowiło 6 par bliźniąt (w tym 3 pary homozygotyczne i 3 pary heterozygotyczne), wśród których jedno z dzieci urodzone było z wrodzonym zarośnięciem przełyku jako wadą izolowaną, a drugi bliźniak był dzieckiem zdrowym. Dzieci były rekrutowane wśród pacjentów Kliniki Chirurgii i Urologii Dziecięcej we Wrocławiu oraz Kliniki Chirurgii, Traumatologii i Urologii Dziecięcej w Poznaniu. Do badania zabezpieczono dwa rodzaje materiału biologicznego – krew pełną pobraną od każdego z bliźniąt celem wykonania badań molekularnych oraz wycinek tkankowy z dolnego odcinka przełyku,

pobrano podczas pierwotnego zespolenia przełyku w torakoskopii (u 5 pacjentów) lub w czasie gastroskopii wtórnej do pierwotnej operacji (u 1 pacjenta). Wycinek z przełyku pobierany był jedynie u bliźniąt z AE. Po izolacji DNA określono zygotyczność bliźniąt oraz wykonano badanie porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy (aCGH). Wykluczono aberracje liczbowe i strukturalne jako przyczynę występowania wady. Badanie całogenomowej analizy metylacji oparto o technikę RRBS (Reduced-representation bisulfite sequencing). Uzyskane wyniki poddano analizie biostatystycznej. Celem wykrycia istotnych statystycznie różnic w metylomie użyto danych opartych o ok 950 tys. dinukleotydów CpG zlokalizowanych w ok 60 tys. wysp CpG. Porównano profile metylacji wysp CpG pomiędzy pacjentami z wrodzonym zarośnięciem przełyku a ich zdrowym rodzeństwem. W przeanalizowanym materiale nie stwierdzono znaczących różnic w hipermetylacji i hipometylacji w obrębie promotorów genów w opisywanych w literaturze jako mogące brać udział w patogenezie zarośnięcia przełyku. Analiza wzbogacenia ścieżek wykazała statystycznie znaczący udział 10 hipermetylowanych genów w ścieżce Rho GTPase, dotychczas nieopisywanych w patogenezie zarośnięcia przełyku. Dotyczy to genów ARHGAP36, ARHGAP4, ARHGAP6, ARHGEF9, FGD1, GD1I1, MCF2, OCRL, STARD8.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorant szeroko, sprawnie i wyczerpująco omawia czynniki środowiskowe i osobnicze oddziałujące na płód w okresie prenatalnym jako przyczynę powstania AE. Wymienia m.in. otyłość, cukrzycę u matki, stosowanie alkoholu, tytoniu, a także adriamycyny. Zaznacza istotną rolę wrocławskiego ośrodka chirurgicznego, który od lat 50’ ubiegłego wieku specjalizuje się w leczeniu tej właśnie wady. Wskazuje, że pomimo znacznego rozwoju genetyki, obecnie jedynie w ok. 10% przypadków możliwe jest ustalenie przyczyny występowania w/w wady. Autor własne wyniki badań zestawia z wynikami z piśmiennictwa. Pracę kończy pięć jasno sformułowanych wniosków. Wynikają one i odpowiadają na pytania zawarte w celach pracy. Wnioski te mogą mieć istotne znaczenie w kolejnych pracach naukowych dotyczących wady. Podkreśla, że różnice w hipermetylacji genów biorących udział w ścieżce molekularnej Rho GTPase mogą wskazywać na udział tej ścieżki w patofizjologii powstawania EA. Badania nad zaburzeniami epigenetycznymi genów z w/w ścieżki w kontekście zarośnięcia przełyku powinny być nadal kontynuowane. W szczególności w powiązaniu z badaniami ekspresji wskazanych genów. Z uwagi na brak różnic w zakresie metylacji opisywanych dotychczas w literaturze genów mogących odpowiadać za etiologię atrezji przełyku wskazuje, że może mieć ona inny mechanizm regulacji ekspresji tych genów. Biorąc pod uwagę technikę RRBS przy użyciu dobrych jakościowo próbek DNA wg autora dostarcza ona dużej ilości danych pod postacią dokładnej charakterystyki metylomu badanej tkanki. Ich analiza może być użyteczna w poszukiwaniu przyczyn wad wrodzonych o dotychczas nieustalonej etiologii.

Reasumując należy stwierdzić, że lek. Michał Błoch wykazał dużą wiedzę oraz orientację w opracowanym zagadnieniu naukowym. Dobrze właściwą metodykę prac, przeprowadził bardzo rzetelną analizę uzyskanych, ciekawych wyników. Ponadto sformułował wnioski zgodnie z postawionymi celami. Dysertacja napisana jest przejrzystym, stylistycznie poprawnym językiem. Praca jest dowodem dojrzałości naukowo-dydaktycznej kandydata.

Ograniczeniem pracy jest niewątpliwie mało liczna grupa badana, co wyraźnie utrudnia rzetelną ocenę statystyczną. Ograniczenie to wynika z niskiej liczby urodzonych pacjentów z AE, a tym bardziej z cięż bliźniaczych, o czym doktorant wspomina w dyskusji pracy, podkreślając, że rekrutował pacjentów w okresie 5 lat w największych ośrodkach chirurgicznych w Polsce.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną rozprawy oceniam dysertację pozytywnie. Uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn.zm.)”

Mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. Michała Błocha do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Marcin Polok

profesor UZ

specjalista chirurg dziecięcy

specjalista urolog dziecięcy

2 1 8 6 9 118