



UMCS

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE

Wydział Biologii i Biotechnologii

Dr hab. n. biol. Roman Paduch, prof. UMCS
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Zakład Wirusologii i Immunologii

Lublin, dn. 04.06.2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr. inż. Marka Cieśli**

pt. "Ocena metylacji DNA i polimorfizmów wybranych genów oraz ekspresji
wyselekcjonowanych mikro-RNA u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów"
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Doroty Darmochwał-Kolarz
promotor pomocniczy dr n. med. Bogdan Kolarz

Rozprawa doktorska mgr. inż. Marka Cieśli dotyczy analizy metylacyjnej DNA, polimorfizmów genów oraz ocenę ekspresji wybranych mikro-RNA w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS). Badania obejmowały analizy *in silico* pomiędzy ekspresją mikro-RNA a występowaniem RZS, ocenę podstawowych, wybranych parametrów we krwi i surowicy pacjentów, jak również analizy molekularne dotyczące stopnia metylacji wybranych genów oznaczanych metylo-specyficznym PCR-MSP oraz oznaczenia polimorfizmów wykonane w oparciu o metodę RT-PCR.

Reumatoidalne zapalenie stawów jest przewlekłą, zapalną, autoimmunologiczną chorobą tkanki łącznej. RZS wpływa na wiele narządów i tkanek, ale przede wszystkim rozpoznawana jest jako schorzenie atakujące błonę maziową stawów. Patogeneza i etiologia choroby nie jest w pełni wyjaśniona, jednakże współwystępowanie określonych czynników genetycznych oraz brak



równowagi między pro- i przeciwzapalnymi cytokinami sprzyja wystąpieniu autoimmunizacji i wyrażeniu jawnej postaci klinicznej choroby. Zaburzenia genetyczno-biochemiczne oraz systemowe zmiany w funkcjonowaniu układu immunologicznego, a zwłaszcza, do czego przychyliła się wielu naukowców, zmian w homeostazie limfocytów $CD4^+$, prowadzi w konsekwencji do stopniowego i nieodwracalnego zniszczenia tkanki. Ocena zmian stopnia metylacji oraz ekspresji wybranych genów, szczególnie tych, które odnoszą się do cytokin, ich receptorów lub czynników regulujących ich aktywność, jest więc istotna z punktu widzenia nie tylko wzbogacenia wiedzy podstawowej na temat RZS, lecz zwłaszcza w odniesieniu do diagnostyki i planowania leczenia tej choroby. Na tej podstawie uważam, że prowadzenie prac badawczych w tej tematyce jest wpisaniem się w aktualny trend, dotyczący ustalania podstaw teoretycznych rozwoju chorób. Mając na uwadze ważny naukowo oraz praktyczny wymiar zaplanowanych badań uważam pojęcie tematu rozprawy doktorskiej za uzasadnione.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska, została przygotowana w układzie klasycznym, który stanowi ogólnie przyjęty standard dla opracowań o charakterze eksperymentalnym. Dysertacja liczy 80 stron, a przedstawiona w niej treść podzielona została na 8 podstawowych rozdziałów wraz z wyróżnionymi podrozdziałami. Opracowanie zostało dodatkowo uzupełnione o 14 rycin i 15 tabel. Tekst jest napisany poprawnie, lecz Autor nie uniknął potknięć językowych, literowych i stylistycznych. Ponadto, w wykazie skrótów wirus Epstein-Barr został opisany nieprawidłowym skrótowcem. Nie powinno być EBC, lecz EBV. Niemniej jednak, przedstawione opisy stanowią spójną całość, ściśle związaną z tytułem dysertacji i postawioną hipotezą badawczą.

W rozprawie, Autor zamieścił **streszczenie** w języku polskim oraz angielskim. Jest to zwięzła prezentacja podstawowych założeń pracy, z wyszczególnieniem wykorzystanych metod, oraz wniosków sporządzonych na podstawie uzyskanych wyników. Rozdział ten jest klarowny pozwalający na szybkie zapoznanie się z podstawami teoretycznymi zaproponowanych badań oraz następstwem analiz prowadzącym do udowodnienia postawionej hipotezy.



Wstęp rozprawy to zwięzły opis prezentujący podstawy teoretyczne rozwoju RZS, oraz epigenetyczną i genetyczną regulację ekspresji genów związaną z tym schorzeniem. Dokonując opisu, Autor słusznie skupił się jedynie na charakterystyce genów, które w dalszej części dysertacji zostały poddane analizie. Z uwagi na wieloaspektową postać RZS, pełna prezentacja innych markerów opisanych dotychczas w literaturze nie stanowiłaby istotnego elementu tego rozdziału, wprowadzającego dane ważne z punktu widzenia całości pracy.

Taka forma prezentacji pozwoliła na wskazanie zasadności wyboru opisanych genów w zaplanowanych i przeprowadzonych badaniach. Uważam więc, że rozdział ten w wystarczającym stopniu prezentuje podstawy teoretyczne związane z podjętym zagadnieniem badawczym. Moja uwaga dotyczy jedynie użycia niezręcznego sformułowania dotyczącego ekspresji wybranych genów w „zdrowych” tkankach. Uważam, że lepszym określeniem jest mówienie o tkankach prawidłowych.

Cel pracy został przedstawiony w formie celu podstawowego, dotyczącego oznaczenia markerów molekularnych w RZS oraz drugoplanowego, polegającego na ocenie polimorfizmów w wybranych genach i skorelowanie ich z wystąpieniem czynnika reumatoidalnego w grupie analizowanych pacjentów. Założenie badawcze zostało przedstawione poprawnie, pozwalając na jego realizację w zakresie zaplanowanych metod badawczych.

Opis wykorzystanych **materiałów** i przeprowadzonych **metod** zastosowanych w ocenianej rozprawie został przedstawiony poprawnie. Uważam, że zaproponowany zakres eksperymentów jest wystarczający do pełnej realizacji założeń badawczych określonych w celu pracy. Wykonanie badań na materiale pobranym od pacjentów uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej. Testy statystyczne użyte do opracowania uzyskanych danych eksperymentalnych, a następnie przeprowadzenia ich analizy zostały dobrane odpowiednio.

Uzyskane **wyniki** badań przedstawione zostały w postaci zwięzłego opisu, klarownych wykresów i tabel. Prezentacja wyników jest usystematyzowana, przedstawiając w logicznej kolejności poszczególne analizy. Obróbka uzyskanych danych jest wykonana poprawnie, pozwalając czytelnikowi na jednoznaczną interpretację wyników badań.



Przeprowadzone analizy i obliczenia są przejrzyste, a przez to wiarygodne. Biorąc powyższe pod uwagę, uważam że Doktorant zrealizował cel pracy, a uzyskane wyniki wpisują się w dyskusję nad efektywniejszym niż dotychczas podejściem do diagnostyki i leczenia RZS.

Dyskusja ocenianej pracy jest rozdziałem, w którym Autor umiejętnie interpretuje uzyskane wyniki w oparciu o dane dostępne w literaturze światowej oraz własną wiedzę. Zakres merytoryczny dyskusji odpowiada zagadnieniom postawionym w celu pracy oraz jest zgodny z zakresem tematycznym przedstawionym w tytule rozprawy. Doktorant interpretuje związki przyczynowo-skutkowe zmian epigenetycznych oraz stopnia ekspresji badanych genów w kontekście rozwoju RZS. W ciekawy sposób wiąże również stopień zaawansowania choroby ze zmianami poziomu wybranych cytokin pro-zapalnych. Uogólniony stan zapalny oraz zmiany w układzie odpornościowym pacjentów z RZS są obecnie udowodnionymi czynnikami stanowiącymi przyczynę, ale również będące skutkiem postępu choroby. Doktorant, skupił się jednak głównie na jednej z podstawowych cytokin stanu zapalnego, a mianowicie na IL-6. Moje pytanie dotyczy roli innych pro-zapalnych cytokin, a mianowicie IL-1 β i TNF- α , które obok IL-6 również pełnią znamienne rolę w patogenezie RZS. Cytokiny te wpływają w istotny sposób, np. na poziom i aktywność enzymów degradujących chrząstkę. Ponadto, pełnią ważną rolę regulacyjną w stosunku do komórek układu odpornościowego, m. in. poprzez regulację transkrypcji i wyrażeniu na powierzchni komórek wybranych cząsteczek kompleksów różnicowania CD. Proszę o przedstawienie, czy regulacja poziomu IL-1 β i TNF- α mogłyby być wykorzystana w terapii RZS?

Wnioski uzyskane na podstawie przeprowadzonych badań zostały przedstawione w 4 punktach. Są one ogólne, odpowiednio podsumowujące przeprowadzone obserwacje.

Piśmiennictwo obejmuje 102 pozycje, dobrane prawidłowo. Są to doniesienia w większości z ostatnich kilku lat, opublikowane w periodykach o zasięgu międzynarodowym. Literatura jest więc aktualna, i dotyczy badań podjętych w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, stwierdzam że Doktorant w pełni wypełnił zadania jakie zostały postawione w celu pracy. Badania wskazują, że zmiany profilu metylacyjnego wybranych



genów, jak również ocena ekspresji określonych mikro-RNA w osoczu pacjentów mogą być użyteczne jako nowoczesne markery diagnostyczne RZS. Autor wskazuje również, że analizy wybranych markerów genetycznych i epigenetycznych są nowoczesnym podejściem do diagnostyki tej choroby, pozwalającymi na wczesne oszacowanie zaburzeń w obrębie układu immunologicznego pacjentów, a tym samym umożliwiającymi podjęcie leczenia zanim pojawią się objawy kliniczne choroby. Uważam, że Doktorant prawidłowo przeprowadził badania, jak również wykazał korelacje między badanymi parametrami a stadiem RZS. Zrealizował tym samym stawiany w rozprawie cel badań. Mocną stroną rozprawy jest wskazanie na możliwość praktycznego zastosowania wybranych markerów w diagnostyce RZS, a tym samym na uzyskanie potencjalnie lepszych niż dotychczasowe efektów prowadzonych terapii.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Marka Cieśli jest więc opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

W zawiązku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Medycznego Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o dopuszczenie mgr. inż. Marka Cieśli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zakład Wirusologii i Immunologii UMCS

dr hab. Roman Paduch, prof. nadzw.

Roman Paduch

