

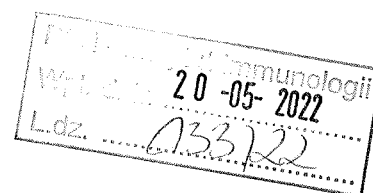
Dr hab. n. med. Magdalena Szmyrka

Wrocław, 17.05.2022

Katedra i Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych

Uniwersytetu Medycznego im Piastów Śląskich we Wrocławiu

## RECENZJA



rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Heleny Wielińskiej

pod tytułem:

**„Analiza wybranych cytokin i profilu miRNA u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów i zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa”**

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) oraz zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK) to przewlekłe zapalne schorzenia układu ruchu, które, jeżeli nie są odpowiednio wcześnie rozpoznane i leczone, prowadzą do niepełnosprawności oraz poważnych powikłań zdrowotnych. Obecnie dostępne, nowoczesne metody leczenia opierają się na celowanym oddziaływaniu na konkretne cytokiny prozapalne oraz szlaki sygnałowe. W leczeniu tych schorzeń dysponujemy przeciwciałami monoklonalnymi hamującymi działanie takich cytokin jak TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IL-23 i inne. Zastosowanie tych leków, określone jako leczenie biologiczne, spowodowało przełom w terapii zapaleń stawów. Mimo postępu wiedzy wciąż jednak część chorych nie odpowiada na zastosowaną terapię, a koszty leczenia są bardzo wysokie. Dlatego dąży się do wprowadzenia leczenia spersonalizowanego, dopasowanego do konkretnego pacjenta. Odpowiedzi na pytanie, jak będzie przebiegać choroba oraz jaka terapia będzie najlepsza dla konkretnego chorego może dostarczyć immunogenetyka i farmakogenetyka.

Powyższą problematyką zajęła się Doktorantka Joanna Wielińska i przedstawiła wyniki swojej pracy badawczej w recenzowanej rozprawie doktorskiej.

Na rozprawę tę składają się cztery powiązane ze sobą tematycznie artykuły, a mianowicie:

**„Interleukin 6 gene polymorphism is associated with protein serum level and disease activity in Polish patients with rheumatoid arthritis”** HLA. 2018,92 (Suppl.2) 38-41

**„Polymorphism within genes coding for IL-17A and F and their receptor as clinical hallmarks in ankylosing spondylitis”** Mediators Inflamm. 2021,2021:312592

**„Exploring the extracellular vesicle MicroRNA expression repertoire in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis treated with TNF inhibitors”** Dis Markers. 2021,2021:2924935

**„MiRNAs as potential biomarkers of treatment outcome in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis”** Pharmacogenomics 2021, 22(5):291-301

Te trzy prace oryginalne i jedna praca pogładowa zostały opublikowane w anglojęzycznych recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym i ich łączny współczynnik wpływu (impact factor) wynosi 13,463.

Badania naukowe zostały przeprowadzone w Laboratorium Immunogenetyki Klinicznej i Farmakogenetyki IITD im L. Hirszfelda we Wrocławiu pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Katarzyny Boguni-Kubik.

Pierwszym zagadnieniem, które podjęła doktorantka, było zastosowanie analizy polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) do wczesnego rozpoznania zapalenia stawów i zróżnicowania pomiędzy RZS i ZZSK, a także możliwość wykorzystania SNP do prognozy odpowiedzi na konkretne leczenie inhibitorami TNF-alfa. Stworzy to potencjalną możliwość odpowiedniego dobrania terapii do profilu genetycznego pacjenta.

Drugie zagadnienie dotyczyło zastosowania analizy profilu mikroRNA, zawartego w pęcherzykach pozakomórkowych u chorych z RZS oraz ZZSK, przed i w trakcie leczenia biologicznego z zastosowaniem przeciwciał anty TNF- $\alpha$ .

Praca, zatytułowana „**Interleukin 6 gene polymorphism is associated with protein serum level and disease activity in Polish patients with rheumatoid arthritis**” polegała na ocenie zależności pomiędzy zmiennością polimorficzną genu IL-6 u chorych na RZS, poziomem IL-6 w surowicy, progresją choroby i odpowiedzią na leczenie inhibitorami TNF- $\alpha$ . Analizowano polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) rs1800795 (-174 G>C) zlokalizowanego na chromosomie 7 w rejonie promotora genu *IL6*. Badania genetyczne przeprowadzono u 130 chorych z RZS i 112 osób zdrowych z zastosowaniem testu TaqMan Real-Time PCR, a poziomy białka IL-6 w surowicy oceniano przed oraz po trzech i sześciu miesiącach leczenia anty-TNF $\alpha$ .

Wykazano, że najczęstszym wariantem genetycznym w badanej grupie były heterozygoty GC. Nie wykazano związku SNP z podatnością na RZS. Stwierdzono, że stężenie cytokiny spada w trakcie leczenia i chorzy z RZS mieli wyższe stężenia IL-6 niż grupa kontrolna. Homozygoty CC mieli najwyższe stężenie IL-6 przed leczeniem i częściej cechowała ich wyższa aktywność choroby.

Przeprowadzone przez doktorantkę analizy są jedynymi przeprowadzonymi w homogennej grupie polskich pacjentów z RZS i sugerują, że homozygotyczność *IL6* rs1800795 CC może odgrywać niekorzystną rolę w RZS.

Kolejna praca zatytułowana „**Polymorphism within genes coding for IL-17A and F and their receptor as clinical hallmarks in ankylosing spondylitis**” przyniosła unikatowe w polskiej populacji wyniki asocjacji genetycznych *IL17RA* rs 4819554 i *IL17RC* rs708567 w ZZSK. Przedmiotem badania była ocena, czy polimorfizmy genów dla *IL17A*, *IL17F* i ich receptorów mają związek z podatnością na zachorowanie na ZZSK, parametrami klinicznymi oraz odpowiedzią na leczenie inhibitorami TNF- $\alpha$ . Do oceny wybrano SNP: *IL17A* rs2275913 (G>A) zlokalizowany na chromosomie 6 w obrębie promotora genu, *IL17F* rs 763780 (A>G) zlokalizowany na chromosomie 22 w eksonie 3, *IL17RA* rs4819554 (G>A) zlokalizowany na chromosomie 22 w obrębie promotora genu oraz *IL17RC* rs708567 (A>G) zlokalizowanego na chromosomie 3 w eksonie 4. Badanie przeprowadzono u 138 pacjentów z ZZSK i 190 osób zdrowych, chorzy byli monitorowani przed leczeniem anty-TNF- $\alpha$  oraz po 3 i 6 miesiącach terapii.

Nie stwierdzono różnic w rozkładzie genotypów i alleli pomiędzy chorymi na ZZSK a osobami zdrowymi, natomiast powiązано warianty genetyczne z parametrami związanymi z aktywnością choroby, takimi jak CRP, wskaźnik VAS (visual analogue scale) oraz wskaźnik BASDAI. Wykazano, że allele lub genotypy związane z większą produkcją IL-17F mogą odgrywać niekorzystną rolę w ZZSK. Polimorfizmy genów dla IL-17 i ich receptorów są powiązane z parametrami klinicznymi aktywności choroby i mają wpływ na przebieg ZZSK oraz mogą być biomarkerami odpowiedzi na leki anti-TNF- $\alpha$  u polskich pacjentów.

Szczególą wartością pracy polega na tym, że była to pierwsza analiza zależności pomiędzy SNP *IL17RA* i *IL17RC* a chorobami reumatycznymi w populacji polskiej.

Trzecia praca oryginalna pod tytułem: „**Exploring the extracellular vesicle MicroRNA expression repertoire in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis treated with TNF inhibitors**” dotyczyła mechanizmów epigenetycznych istotnych w patogenezie chorób zapalnych stawów. Przeprowadzono w niej profilowanie ekspresji mikroRNA w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EV) u pacjentów z RZS oraz ZZSK przed oraz w trakcie leczenia anti-TNF $\alpha$ . Mikro RNA są to jednoniciowe, niekodujące, endogenne cząsteczki mRNA, długości średnio 22 nukleotydów, które należą do najważniejszych cząsteczek regulujących ekspresję genów. Mogą one być wykrywane w różnych płynach ustrojowych lub też oznaczane w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych. Dysregulacja ekspresji miRNA jest związana z nasileniem sygnalizacji szlaków zapalnych, wydzielaniem cytokin prozapalnych oraz procesami autoimmunizacji.

Praca pozwoliła na zidentyfikowanie 12 miRNA, których profile ekspresji istotnie różniły się pomiędzy chorymi z RZS i ZZSK, a ponadto wykryto cztery cząsteczki, których ekspresja zmieniała się po 3 miesiącach terapii anti-TNF $\alpha$  w RZS oraz 14 cząsteczek, które ulegały zmianie po terapii anti-TNF- $\alpha$  w ZZSK. Mogą one być wykorzystywane jako nowy, nieinwazyjny marker diagnostyczny oraz predyktor przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie.

Badania te miały charakter nowatorski i wykazały, że profilowanie miRNA z EVs może być wykorzystane do wykrywania biomarkerów diagnostycznych oraz przepowiadających odpowiedź na leczenie w RZS i ZZSK.

Ostatnia praca zamykająca cykl publikacji rozprawy doktorskiej pod tytułem: „**MiRNAs as potential biomarkers of treatment outcome in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis**” ma charakter przeglądowy i dotyczy roli cząsteczek miRNA w przebiegu leczenia chorych na RZS i ZZSK inhibitorami TNF $\alpha$ .

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, ma nowatorski charakter i zawiera unikatowe analizy.

Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością tematu i podjęła się realizacji zagadnień dotychczas nie przebadanych w populacji polskich chorych na RZS i ZZSK. Zastosowała nowoczesne metody badawcze, zrealizowała postawione cele badań i uzyskała odpowiedzi na postawione pytania. Ponadto dokonała dogłębnej analizy aktualnej wiedzy na podjęty temat oraz przeprowadziła szczegółową dyskusję wyników swoich badań w jej kontekście. Uzyskane wyniki wyczerpująco odpowiedziały na postawiony problem badawczy. Mają one

charakter nowatorski i mogą mieć zastosowanie praktyczne przy planowaniu leczenia biologicznego chorych na zapalenia stawów.

Najważniejsze wnioski z przeprowadzonych badań są następujące:

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w obrębie promotora genu *IL-6* wiąże się z poziomem tej cytokiny w surowicy pacjentów i aktywnością choroby.

Polimorfizm *IL17F* może wpływać na wynik terapii anty-TNF, a wraz z wariantami genetycznymi receptora *IL17RA* jest związany z aktywnością choroby u pacjentów z ZZSK po leczeniu anty-TNF.

Genotypowanie polimorfizmów wybranych cytokin prozapalnych i ich receptorów może mieć potencjał predykcyjny u pacjentów z chorobami reumatycznymi populacji polskiej.

MikroRNA mogą być obiecującymi markerami diagnostycznymi i prognostycznymi w patogenezie RZS i ZZSK oraz odpowiedzi pacjentów na leczenie biologiczne

Doktorantka jest autorką 8 publikacji oryginalnych i 1 pracy pogładowej w międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku wpływu. W celu rozwoju naukowego i udoskonalenia warsztatu badawczego odbyła wiele szkoleń zagranicznych i krajowych. Doktorantka uczestniczyła jako wykonawca w grantach NCN OPUS 11, a za swój dorobek została wyróżniona nagrodą Stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów a w czasie studiów Stypendium Rektora dla najlepszych studentów Politechniki Łódzkiej. Ponadto była beneficjentką licznych stypendiów na wyjazdy badawcze i konferencje naukowe.

Rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny i spełnia wszystkie warunki określone w ustawie z dn. 14 marca 2003 o stopniach naukowych, dlatego też przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN wniosek o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto wnioskuję o wyróżnienie rozprawy nagrodą ze względu na jej bardzo wysoki poziom naukowy i nowatorski charakter oraz możliwość praktycznego zastosowania przedstawionych wyników.

Z poważaniem

Dr hab. n. med. Magdalena Szmyrka

