

dr hab. n. med. Agnieszka Paradowska-Gorycka Warszawa,  
Centrum Wsparcia Badań Klinicznych,  
oraz Zakład Biologii Molekularnej  
Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji  
ul. Spartańska 1  
02-637 Warszawa

12 maja 2022 roku

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Heleny Wielińskiej**

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

**Promotor: prof. dr hab. n. med. Katarzyna Bogunia-Kubik**

Rosnąca liczba zachorowań na choroby cywilizacyjne, a dzisiaj takimi możemy już nazywać choroby reumatyczne, pociąga za sobą większe zapotrzebowanie na szybszą i sprawniejszą diagnostykę a także na nowe metody terapii. Choroby reumatyczne, do których zaliczamy reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) oraz zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK), to powszechny problem zdrowotny światowej populacji, dotyczący ponad 350 milionów ludzi na świecie. Te przewlekłe, postępujące choroby zapalne prowadzą do obniżenia sprawności fizycznej i wzrostu zwyrodnienia stawów.

RZS i ZZSK to przewlekłe stany zapalne, które wiążą się z zapaleniem ogólnoustrojowym. RZS jest heterogenną chorobą autoimmunologiczną związaną z symetrycznym zapaleniem stawów, prowadzącym do zniszczenia kości i chrząstki. ZZSK w przeciwieństwie do RZS, dotyczy głównie szkieletu osiowego, przyczepów ścięgniastych i dużych asymetrycznych stawów. Dane epidemiologiczne wskazują, że zarówno RZS, jak i ZZSK to jednostki chorobowe o wieloczynnikowej etiologii, gdzie predyspozycja genetyczna, stymulujące działanie czynników środowiskowych oraz zaburzenia w regulacji immunologicznej są w różnym stopniu odpowiedzialne za powstawanie oraz rozprzestrzeniania się zmian zapalnych. Chociaż są bardzo blisko spokrewnione, ich symptomatologia i etiologia są różne, a ich etiopatogeneza nie została w pełni poznana. Badania asocjacyjne całego genomu (GWAS) potwierdziły wysoką dziedziczność RZS czy ZZKS oraz wzbogacenie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) związanych z RZS/ZZSK w geny aktywne w limfocytach T CD4+ lub z nimi związane. Lepsze zrozumienie tych obszarów przełożyło się na skuteczne terapie, które zrewolucjonizowały ich leczenie. Ukierunkowane terapie immunologiczne, takie jak inhibitory czynnika martwicy nowotworu (TNF), są szeroko stosowane w leczeniu RZS. Jednak mniej niż jedna czwarta pacjentów osiąga remisję po 6 miesiącach. Alternatywne szlaki cytokinowe (a zatem potencjalne terapie) mogą być istotne u tych pacjentów. Co więcej, odpowiedź na leczenie różni się znacznie między pacjentami, a

ekspresja specyficznych microRNA może to wyjaśnić oraz pomóc klinicyście wybrać odpowiedni sposób leczenia.

Pomimo różnic w obrazach klinicznych i chorobach współistniejących, rozróżnienie RZS i ZZSK w stadium „wczesnego zapalenia stawów” nadal uważane jest za wyzwanie w praktyce klinicznej. Trwają badania nad użytecznością i specyficznością markerów serologicznych w diagnostyce lub prognozowaniu chorób reumatycznych. Uważa się, że autooprzeciwiaczą się przydatne u pacjentów z wczesnym zapaleniem stawów, ale u prawie 30% pacjentów z dodatnim wynikiem czynnika reumatoidalnego (RF), przeciwciał przeciw peptydom antycytrulinowym (ACPA) lub przeciwciał przeciwko karbamyłowi peptydom (CARB) nie rozwija się RZS i 40% przypadków RZS jest seronegatywnych. W rzeczywistości nie istnieją idealne panele biomarkerów serologicznych dla ZZSK; w związku z tym istnieje silna potrzeba zidentyfikowania nowych czynników, które pozwalają odróżnić wczesne RZS od ZZSK.

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Heleny Wielińskiej została przygotowana na podstawie spójnego tematycznie zbioru czterech artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych na temat roli wybranych cytokin i microRNA w predyspozycji do, jak i w przebiegu klinicznym reumatoidalnego zapalenia stawów oraz zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa:

- Wielińska J, Dratwa M, Świerkot J, Korman L, Iwaszko M, Wysoczańska B, Bogunia-Kubik K. Interleukin 6 gene polymorphism is associated with protein serum level and disease activity in Polish patients with rheumatoid arthritis. *HLA*. 2018 Dec;92 Suppl 2:38-41. doi: 10.1111/tan.13355.
- Wielińska J, Świerkot J, Kolossa K, Bugaj B, Chaszczewska-Markowska M, Jeka S, Bogunia-Kubik K. Polymorphisms within Genes Coding for IL-17A and F and Their Receptor as Clinical Hallmarks in Ankylosing Spondylitis. *Mediators Inflamm*. 2021 Oct 27;2021:3125922. doi: 10.1155/2021/3125922.
- Wielińska J, Crossland RE, Łacina P, Świerkot J, Bugaj B, Dickinson AM, Bogunia-Kubik K. Exploring the Extracellular Vesicle MicroRNA Expression Repertoire in Patients with Rheumatoid Arthritis and Ankylosing Spondylitis Treated with TNF Inhibitors. *Dis Markers*. 2021 Sep 30;2021:2924935. doi: 10.1155/2021/2924935.
- Wielinska J, Bogunia-Kubik K. miRNAs as potential biomarkers of treatment outcome in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Pharmacogenomics*. 2021 Apr;22(5):291-301. doi: 10.2217/pgs-2020-0148. Epub 2021 Mar 26. PMID: 33769067.

We wszystkich czterech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Łączny IF przytoczonych prac wynosi 13,463. Oprócz załączonych publikacji Doktorantka zamieściła streszczenie w języku polskim i angielski oraz Autoreferat zawierający wprowadzenie, cel badań, omówienie wyników badań, wnioski, bibliografię, notkę biograficzną oraz dorobek naukowy.

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Heleny Wielińskiej dobrze wpisuje się w opisane powyżej nurty badań. Praca Kandydatki przedstawia niezwykle istotne, z punktu widzenia etiologicznego, klinicznego oraz potencjalnie terapeutycznego, badania podejmujące próbę określania markerów stanu zapalnego związanych z podatnością na wybrane choroby reumatyczne oraz wynikami stosowanych terapii. Autorka w swojej pracy skupiła się na: analizie wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) w genach kodujących cytokiny (*IL-6*, *IL-17A*, *IL-17F*) oraz ich receptory (*IL-17RA*, *IL-17RC*); określeniu poziomów tych cytokin w surowicy oraz określeniu repertuaru microRNA (miRNA) w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych u pacjentów z RZS i ZZSK. Zebrane dane eksperymentalne zostały przeanalizowane w odniesieniu do parametrów klinicznych, wskaźników aktywności choroby oraz odpowiedzi na terapie anty-TNF.

We wstępie Doktorantka w sposób syntetyczny przedstawiała epidemiologiczne i kliniczne aspekty RZS i ZZSK. Omówiła także rolę cytokin i miRNA w patomechanizmie badanych jednostek chorobowych oraz rolę miRNA jako potencjalnych markerów molekularnych.

W przedstawionych publikacjach prawidłowo zostały opisane zastosowane procedury badawcze. W badaniu oceniającym SNP genu *IL-6* wzięło udział 130 pacjentów z RZS oraz 112 osób zdrowych. Z kolei w badaniu oceniającym związek SNP genów *IL-17A/F* i ich receptorów z ZZSK, grupa badana składała się ze 138 pacjentów z ZZSK oraz 190 osób zdrowych. Natomiast w badaniu oceniającym profil ekspresji miRNA w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych brało udział 3 pacjentów z RZS i 3 pacjentów z ZZSK. Czy Doktorantka planuje lub może rozpoczęła już badania nad wyselekcjonowanymi miRNA na większych grupach chorych?

Uzyskane wyniki zostały przedstawione w sposób poprawny i mogą mieć w przyszłości znaczenie praktyczne, a w szczególności wyniki dotyczące profilowania ekspresji miRNA. Na podstawie przeprowadzonych analiz nie zaobserwowano związku pomiędzy polimorfizmami genu *IL-6* a podatnością na RZS oraz pomiędzy SNP genów *IL-17A/F*, *IL-17RA* i *IL-17RC* a podatnością na ZZSK. Znalezione natomiast zależności pomiędzy analizowanymi polimorfizmami a niektórymi parametrami klinicznymi. Doktorantka wykazała, że genotyp *IL-174CC* związany jest z wyższą aktywnością RZS oraz z najwyższymi stężeniami *IL-6* przed rozpoczęciem leczenia anty-TNF. Ponadto, wykazano, że stężenie *IL-6* spada podczas leczenia. Czy Doktorantka weryfikowała jak zmienia się parametr DAS-28 podczas leczenia? i jak koreluje ze stężeniem *IL-6*? Zaobserwowano również, że pacjenci z ZZSK posiadający genotyp *IL-17A* rs2275913 GG i GA mają wyższe wartości VAS przed leczeniem, z kolei homozygoty AA wykazywały niską lub umiarkowaną aktywność choroby. Pacjenci posiadający allel G w genie *IL-17RA* rs4819554 odznaczali się wyższymi wartościami VAS po 3 i 6 miesiącach leczenia anty-TNF oraz BASDAI po 3 miesiącach leczenia anty-TNF. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano również związek allelu G w genie *IL-17RC* z późniejszą zapadalnością na ZZSK. Przeprowadzone analizy pozwoliły na zidentyfikowanie 12 miRNA, których profil ekspresji różnił się między pacjentami z RZS i ZZSK przed zastosowaniem leczenia anty-TNF. Ekspresja miR-125-5p, -130b-3p, -151a-5p, -301a-3p, -324-5p była podwyższona w surowicy pacjentów z RZS, natomiast ekspresja miR-376c-3p, -378h, -411-5p, -548a-5p, -548n, -548q, -579-3p była istotnie wyższa w surowicy pacjentów z ZZSK. Wykryto

również 4 miRNA, które charakteryzowały się zwiększoną ekspresją po 3 miesiącach terapii anty-TNF u pacjentów z RZS: miR-520h, -498, -548n, i -19b-3p. W badaniu wykazano również 14 cząstek miRNA, które zmieniały swój profil ekspresji po zastosowaniu leczenia anty-TNF u pacjentów z ZZSK. Na podstawie przeprowadzonych analiz *in silico* zaobserwowano, że wszystkie opisane w pracy miRNA są zaangażowane w szlak sygnalizacji Wnt. Czy Doktorantka ma własne spostrzeżenia z tym związane? Czy planuje rozszerzyć badania w tym zakresie?

Wnioski sporządzone na podstawie otrzymanych wyników są logiczne i odpowiadają ustalonym celom pracy.


Uwagę recenzenta zwróciło dodanie notki biograficznej oraz dorobku naukowego Doktorantki, która wykazuje się dużą aktywnością naukową. Jest autorem/współautorem 8 prac oryginalnych, 1 pracy przeglądowej oraz 9 doniesień konferencyjnych. Uczestniczyła w 4 stażach/szkoleniach zagranicznych. Doktorantka na swoim koncie posiada również liczne nagrody, wyróżnienia czy stypendia naukowe/wyjazdowe.

Oceniona rozprawa nie budzi zastrzeżeń merytorycznych, a przytoczone powyżej pytania oraz poniżej uwagi mają charakter redakcyjny, są sugestiami, które mogą być uwzględnione przy przygotowywaniu kolejnych publikacji:

- brak wykazu stosowanych skrótów,
- nazwy genów zawsze należy pisać kursywą,
- gdy raz zastosuje się skrót, to w dalszych częściach pracy powinno się już raczej stosować skrót a nie pełną nazwę,
- Doktorantka w pracy w kilku miejscach, niepotrzebnie, podaje skróty nazw już wcześniej przytoczonych; np. str 5, str 10, str 11 polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP),
- brak w autoreferacie informacji o wielkości badanych grup w przypadku profilowania ekspresji miRNA.

Podsumowując, przedłożoną do oceny rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Praca jest obszernym i nowoczesnym opracowaniem naukowym bardzo istotnym z punktu widzenia klinicznego. Uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Heleny Wielińskiej pt. „Analiza wybranych cytokin i profilu miRNA u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów i zeszywniającymi zapaleniami stawów kręgosłupa” jest oryginalnym dorobkiem Doktorantki i spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Z przyjemnością zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr inż. Joanny Heleny Wielińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie pracy.

Kierownik Centrum Wsparcia Badań Klinicznych  
Narodowy Instytut Geriatrii, Reumatologii  
i Rehabilitacji w Warszawie  
  
dr hab. n. med. Agnieszka Paradowska-Gorycka, prof. NIGRI