

Szczecin, 16.05.2024 r.

Prof. dr hab. Violetta Dziedziejko  
Katedra Biochemii i Chemii Medycznej  
Samodzielna Pracownia Biochemii Farmaceutycznej  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie  
Al. Powstańców Wlkp. 72  
70-111 Szczecin

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Pana mgr inż. Tomasza Kmiołka, przedstawionej jako monotematyczny cykl trzech publikacji pod wspólnym tytułem: „**Regulacja epigenetyczna oraz jej wpływ na równowagę komórek Th17/Treg u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów**”.

**Promotor rozprawy:** dr hab. n. med. Agnieszka Paradowska-Gorycka, prof. NIGRiR

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) to autoimmunologiczna, przewlekła choroba zapalna atakująca stawy i różne narządy. Najbardziej charakterystycznym jej objawem jest ból, sztywność oraz obrzęk stawów rąk i stóp, ale zapalenie może dotyczyć także innych stawów. Nieleczona choroba prowadzi najczęściej do zniszczenia stawów i ciężkiej niesprawności. RZS jest chorobą systemową, atakującą nie tylko stawy, ale również wiele narządów (zwłaszcza postać długotrwała, o ciężkim przebiegu). Wczesne zastosowanie skutecznego leczenia hamuje postęp choroby, zapobiega jej powikłaniom i umożliwia normalne funkcjonowanie. Przyczyn RZS w pełni nie poznano. Najprawdopodobniej do rozwoju choroby konieczne jest współistnienie wielu czynników w tym defektu układu odpornościowego. Patogeneza jest bardzo złożona i obejmuje proliferację i zwłóknienie komórek błony maziowej, tworzenie błony naczyńniowej oraz erozję chrząstki i kości. Choroba częściowo przebiega z udziałem komórek T, które są ważne w procesie zapalnym. Pomocnicze limfocyty T (*ang. T Helper Cells, Th*) CD4<sup>+</sup> regulują odpowiedzi immunologiczne w odniesieniu do wielu patogenów. Populacja limfocytów T CD4<sup>+</sup> charakteryzuje się szeregiem odrębnych podzbiorów komórek, takich jak Th1, Th2, Th17, regulatorowe limfocyty T (Treg) czy Tfh - każda z określonymi funkcjami i programatorami ekspresji genów - ale także plastycznością pomiędzy różnymi podzbiorami komórek Th. Nieprawidłowa odpowiedź humoralna prowadzi do nadmiernej aktywacji limfocytów T i B, co powoduje nieprawidłową produkcję przeciwciał, takich jak RF (*czynnik reumatoidalny*) i anty-CCP (*cykliczny cytrulinowany peptyd*) oraz zapalenia błony maziowej i uszkodzenia

stawów. Ostatnio intensywnie badane są Th17 i Treg, które kontrolują wzajemną proliferację w celu utrzymania równowagi. Mechanizmy rządzące równowagą różnicowania komórek Th17/Treg odgrywają ważną rolę w szeregu ważnych odpowiedzi biologicznych, w tym funkcji odpornościowej, wzroście komórkowym, różnicowaniu i hematopoezie.

Stale poszukiwane są markery określające predyspozycję do zachorowania na choroby autoimmunologiczne w tym RZS, wpływające na przebieg kliniczny oraz aktywność procesu chorobowego, pomagające w prognozowaniu odpowiedzi na zastosowaną terapię i co ważne umożliwiające odróżnienie od innych chorób autoimmunologicznych. Stąd też uważam, że temat podjęty przez Doktoranta w niniejszej rozprawie doktorskiej jest niezwykle ważny i aktualny, tak pod względem poznawczym, jak i klinicznym.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl trzech wartościowych publikacji w czasopismach umieszczonych na Liście Filadelfijskiej o **łącznym IF=19,484** wg bazy Journal Citation Reports i **punktacji MNiE 420**. W dwóch pracach Doktorant jest pierwszym, a w jednej szóstym autorem. Jedną z prac cyklu to publikacja pogładowa.

**Kmiólek T.; Rzeszotarska E.; Wajda A.; Walczuk E.; Kuca-Warnawin E.; Romanowska-Próchnicka K.; Stypińska B.; Majewski D.; Jagodziński P. P.; Pawlik A.; Paradowska-Gorycka A.** *The Interplay between Transcriptional Factors and MicroRNAs as an Important Factor for Th17/Treg Balance in RA Patients. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 19. Impact Factor: 5,923, Punktacja MNiE: 140*

*Paradowska-Gorycka A.; Wajda A.; Romanowska-Próchnicka K.; Walczuk E.; Kuca-Warnawin E.; Kmiólek T.; Stypińska B.; Rzeszotarska E.; Majewski D.; Jagodziński P. P.; Pawlik A. Th17/Treg-Related Transcriptional Factor Expression and Cytokine Profile in Patients With Rheumatoid Arthritis. Front. Immunol. 2020, 11, 572858. Impact Factor: 7,561, Punktacja MNiE: 140*

**Kmiólek T.; Paradowska-Gorycka A.** *miRNAs as Biomarkers and Possible Therapeutic Strategies in Rheumatoid Arthritis. Cells 2022, 11, 452. Impact Factor: 6,0, Punktacja MNiE: 140*

Doktorant przygotował opis w którym zawarł klasyczne rozdziały rozprawy doktorskiej, czyli wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, wnioski i streszczenie.

Rozprawę doktorską otwiera część teoretyczna – „Wstęp”, który składa się z pięciu podrozdziałów. Autor dokonuje tu wprowadzenia w podjętą tematykę jaką jest reumatoidalne zapalenie stawów, charakteryzuje czynniki transkrypcyjne związane z funkcjonowaniem komórek Th17 i Treg i ich rolę w patogenezie RZS. Wyjaśnia mechanizmy molekularne związane z czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za balans komórek Th17/Treg oraz mechanizmy regulacji cytokin. W dalszych podrozdziałach opisuje potencjalną rolę microRNA w patogenezie RZS oraz wskazuje na możliwy wpływ miRNA w balansie komórek Th17/Treg oraz reakcjach zapalnych. Doktorant wyjaśnia również możliwość uznania miRNA jako diagnostycznego i/lub prognostycznego biomarkera dla RZS. W ostatnim rozdziale przybliży możliwe w przyszłości terapie miRNA w reumatoidalnym zapaleniu stawów.

Piśmiennictwo zostało dobrze dobrane. Uważam, że część teoretyczna rozprawy napisana została merytorycznie, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy w zakresie omawianych zagadnień i ma istotny związek z dalszą częścią badawczą pracy.

Doktorant podjął się ambitnego zadania, jakim była rola wybranych miRNA w rozwoju oraz obrazie klinicznym reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Cel pracy jest zrozumiały i zgodny z zawartością tematyczną. Szczegółowe cele pracy dotyczyły: 1) analizy wpływu wybranych czynników transkrypcyjnych i miRNA na balans komórek Th17/Treg oraz patogenezę RZS; 2) znalezienia wśród wybranych czynników transkrypcyjnych i miRNA biomarkerów o potencjale diagnostycznym bądź prognostycznym w celu wczesnego wykrywania RZS; 3) lepszego zrozumienia wpływu miRNA na regulację czynników transkrypcyjnych w balansie Th17/Treg. Bardziej szczegółowe cele są zawarte w trzech publikacjach.

W kolejnym rozdziale „Materiał i metody” przedstawiono charakterystykę badanej grupy pacjentów. Populację badaną stanowili pacjenci z RZS, natomiast pacjenci z chorobą zwyrodnieniową stawów (*ang. Osteoarthritis, OA*) oraz osoby zdrowe (*ang. Healthy control, HC*) stanowiły grupy kontrolne. Pacjenci z RZS oraz z OA zostali zrekrutowani w Narodowym Instytucie Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie oraz w Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu. Nie podano jednak gdzie zrekrutowano zdrowe osoby do badań.

Liczebność grup była różna w zależności od przeprowadzanych badań. Oceny stężeń cytokin oraz poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych we krwi wykonano u 45 pacjentów z RZS, 27 pacjentów z OA oraz 46 zdrowych osób. Ocena poziomu ekspresji

czynników transkrypcyjnych w komórkach Th17/Treg przeprowadzono w grupie 15 pacjentów z RZS, 15 pacjentów z OA oraz 15 zdrowych osobach. Analizę poziomu ekspresji miRNA w komórkach Th17 i Treg przeprowadzono w próbkach pochodzących od 15 pacjentów z RZS, 11 z osteoarthritis i 15 osób zdrowych. Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji (protokół zatwierdzenia nr 29 czerwca 2016 r.).

W pracy doktorskiej zastosowano następujące metody analityczne: cytometrię przepływową do detekcji komórek Th17 i Treg, izolację RNA z krwi obwodowej pacjentów za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu do izolacji (A&A Biotechnology, Poland), izolację RNA z komórek Th17 i Treg za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu (miRNeasy Micro Kit Qiagen, Germany), metodę RT-PCR z zastosowaniem sond TaqMan do oceny ekspresji czynników transkrypcyjnych oraz miRNA, immunoenzymatyczną metodę ELISA do oceny stężeń wybranych cytokin w surowicy.

Dobór nowoczesnych metod analitycznych do tego typu badań jest jak najbardziej adekwatny.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, w której dobór stosowanych metod i narzędzi statystycznych jest właściwy.

W dalszej części „przewodnika” Doktorant w syntetyczny sposób opisał wyniki badań przedstawione w dwóch publikacjach eksperymentalnych. Do najważniejszych wyników rozprawy należy wykazanie pozytywnych korelacji pomiędzy miR-26 i ekspresją czynników transkrypcyjnych *SMAD3*, *STAT3*, *SOCS1*; oraz miR-155 i *STAT3* w komórkach Th17 u pacjentów z RZS oraz dodatnie korelacje pomiędzy miR-26 i *SOCS1*; miR-31, -155 i *SMAD3*; oraz miR-155 i *SMAD4* w komórkach Treg u pacjentów z RZS. Stwierdzono również negatywną korelację między miR-26, -126 i *STAT5a* w komórkach Treg pochodzących od pacjentów z RZS. Wykazano, że ekspresja miR-31 w komórkach Th17 od pacjentów z RZS z  $DAS28 \leq 5,1$  jest wyższa, a ekspresja miR-24 w komórkach Treg u pacjentów z RZS jest niższa w porównaniu do pacjentów z  $DAS28 > 5,1$ . W komórkach Th17 nie wykryto ekspresji *STAT5* i *HELIOS*. Zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją *SMAD3* i *STAT3* u chorych na RZS, oraz negatywną pomiędzy *HIF-1A*, *SMAD2* a wartością wskaźnika DAS28 w komórkach Treg u pacjentów z RZS.

Na podstawie analizy ROC określono potencjał diagnostyczny kombinacji ekspresji czynników transkrypcyjnych *HIF1A*, *SMAD3* i *STAT3* w celu odróżnienia pacjentów z RZS od HC oraz kombinacji ekspresji *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4* i *STAT3* dla odróżnienia pacjentów z RZS od pacjentów z OA (AUC 0,95).

Otrzymane wyniki zostały opisane w sposób zrozumiały. Graficznie wyniki zaprezentowano w publikacjach. Jako recenzentka mam świadomość, że z tak ogromnej ilości wyników sformułowanie syntetycznych i wymiernych naukowo wniosków nie było łatwe. Autor wraz z zespołem poradzi sobie profesjonalnie.

Doktorant zamieścił w rozprawie: streszczenie w języku polskim oraz w języku angielskim, które w sposób zwięzły prezentują cel badań, wyniki i wnioski.

Cytowane piśmiennictwo obejmuje 135 pozycji literaturowych anglojęzycznych, w większości z ostatnich kilku lat.

Merytoryczny udział autorów wykazano w opublikowanych pracach.

Oceniana rozprawa nie budzi zastrzeżeń merytorycznych, a przytoczone poniżej uwagi mają charakter redakcyjny, są drobnymi niedoskonałościami językowymi lub są sugestiami, które mogą być uwzględnione podczas kontynuacji badań i przygotowania kolejnych publikacji.

- we „wstępie” w wielu miejscach stwierdziłam brak poprawnej odmiany słów w języku polskim oraz błędy stylistyczne np. „ze zmniejszeniem aktywności choroby we wczesnym etapie RZS po rozpoczęciu terapii metotreksat (MTX) i/lub glikokortykosteroidów” str.19; „biorących udział w rozwój RZS” str. 21; „różnica ta jednak nie była istotnie statystycznie” str. 33; „w komórkach Treg u pacjentów z RZS z RF dodatnim wynikiem” str. 39; „u pacjentów z RZS od niskim DAS-28”, „w komórkach Treg niż z pacjenci z anty-CCP z ujemnym wynikiem”...streszczenie; ... str.14, 17, 18, 22.
- str. 15 niedoskonałości językowe: „ich wyniki wskazują”...lepiej autorzy stwierdzili/wykazali...wykazano/stwierdzono [cytowanie], str. 24 – „została przeprowadzona na grupie pacjentów z RZS”, str. 27 komercyjnie dostępnego kitu – poprawnie komercyjnie dostępnego zestawu, str. 27 została przeprowadzona na termocyklerze – w termocyklerze/ z zastosowaniem termocyklera, str. 28 do eppendorffów, do probówek typu eppendorff, str. 29 za pomocą jednoczynnikowej ANOVY - za pomocą jednoczynnikowej analizy ANOVA, str. 31 „w zdrowej kontroli” – u osób zdrowych
- str. 19 „obniżenia wartości TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, CRP” – powinno być precyzyjnie stężeń TNF- $\alpha$ , IL-6.....
- w przypadku analizy cytokin, kreatyniny, CRP wyniki otrzymujemy w konkretnych jednostkach miar czyli wyrażamy stężenie/-a a nie poziomy
- str. 25 tabela 1, 2 – zdecydowanie poprawniej byłoby użyć wszystkich skrótów w jednym języku - polskim lub angielskim – RA, OA, HC ...; ”Larsen” – powinno być punktacja w skali Larsena; Glucocorticoids – powinno być w języku polskim Glikokortykosteroidy

- str. 30, niepoprawnie użyte słowo „częstotliwość”, powinno być występowanie...odsetek komórek Th17 i Treg w populacji PBMC; ponadto niezrozumiełe są podane wartości „Procent komórek Treg (CD4+CD25highCD127-) u pacjentów z RZS (5, 9%; 4- 12, 10%) był niższy niż u pacjentów z OA (11, 40%; 5, 10- 18, 20%) i osób zdrowych (8, 9%; 4, 60- 17, 50%)”.
- str. 30 „wskaźnik współczynnika stosunku Th17/Treg u pacjentów z RZS był niższy niż w HC” czy autor miał na myśli stosunek komórek Th17/Treg?
- str. 33 „Co więcej inne geny (*FOXP3*,.....) nie miały statystycznie istotnych różnic między grupami RZS. Wysoka korelacja została odkryta między ekspresją *FOXP3* i *RORc* u pacjentach RZS z RF ujemnym wynikiem ( $r= 0,9$ ,  $p= 0,001$ ). Czy możemy pisać – geny nie miały???
- str. 36, str 37 Ujemna korelacja została zaobserwowana między ekspresją miR-26 a ekspresją *STAT5A* ( $r= 0,63$ ,  $p= 0,04$ ) i pomiędzy miR-126 a *STAT5A* ( $r= 0,85$ ,  $p= 0,0015$ ). Współczynnik korelacji rang Spearmana dla korelacji ujemnej/negatywnej powinien być wartością ujemną ....a tu pomyłka  $r=0,63$ ,  $r=0,85$ ....
- str. 37 opisując korelacje powinniśmy pamiętać aby wskazać kierunek (dodatnia/pozytywna lub ujemna/negatywna)
- Doktorat jako całość rozprawy zgłosił cykl trzech publikacji. Zabrakło w przewodniku wskazania z której pracy pochodzą konkretne wyniki i w odpowiednich miejscach odniesienia/nawiązania do opublikowanej pracy poglądowej. Doktorant w wykazie piśmiennictwa nie wykazał prac: *Front. Immunol. 2020* oraz *Cells 2022*. Jako recenzentka zorientowałam się, że część informacji z publikacji poglądowej jest w przewodniku np. we wstępie czy dyskusji, ale zdecydowanie zabrakło mi nawiązania właśnie do opublikowanej pracy poglądowej która jest bardzo wartościowa.
- wartości IF publikacji ujętych w cyklu powinny dotyczyć roku opublikowania – dlatego też po dokładnym sprawdzeniu w bazie JCR sumaryczny IF opublikowanych prac w cyklu *Int. J. Mol. Sci 2020*, *front. Immunol. 2020*, *Cells 2022* wynosi 19,484 a nie jak wskazuje Doktorant 22,66.

Zgadzam się z bardzo trafnymi ograniczeniami wskazanymi przez Doktoranta w pracach eksperymentalnych, świadczy to o Jego dojrzałości naukowej.

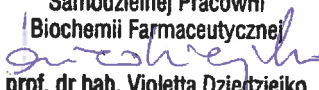
Reasumując. Przedłożoną do oceny rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Jest to obszerne, nowatorskie opracowanie tematu, bardzo istotnego z klinicznego punktu widzenia. Zebranie materiału klinicznego, dobór nowoczesnych metod badawczych

oraz analiza parametrów genetycznych i biochemicznych umożliwiły uzyskanie wiarogodnych wyników, które mogą mieć znaczenie w praktyce klinicznej. Obiektywnym tego potwierdzeniem jest opublikowanie wyników w czasopiśmie umieszczonym na Liście Filadelfijskiej o znacznym współczynniku oddziaływania (IF).

**Wniosek końcowy:**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytułach z zakresu sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455, z 2017 r., poz. 1789; z 2023 r. poz. 742). Mam przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Tomasza Kmiołka do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Biorąc pod uwagę wartość naukową, nowatorski charakter badań, znaczenie poznawcze i praktyczne uzyskanych wyników oraz fakt opublikowania wartościowych wyników w renomowanych czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

KIEROWNIK  
Samodzielnej Pracowni  
Biochemii Farmaceutycznej  
  
prof. dr hab. Violetta Dziedziejko

