

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Tomasza Kmiołka

pod tytułem:

„Regulacja epigenetyczna oraz jej wpływ na równowagę komórek Th17/Treg u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów”

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest jednym z najczęstszych schorzeń zapalnych stawów o podłożu autoimmunologicznym. Patogeneza RZS jest złożona i wiedza na jej temat stale się rozwija. Nadal trwają poszukiwania biomarkerów możliwych do wykorzystania w diagnostyce i planowaniu terapii RZS. Dzięki odkryciom dotyczącym roli cytokin zapalnych oraz cząsteczek biorących udział w szlakach sygnałowych w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów opracowywane są nowe metody terapeutyczne. Obecnie dysponujemy szerokim wachlarzem tak zwanych leków biologicznych, które pozwalają na celowaną ingerencję na poziomie cytokin prozapalnych i cząsteczek przekazujących sygnał wewnątrzkomórkowy.

Istotnym zjawiskiem w patogenezie RZS oraz innych schorzeń autoimmunologicznych i zapalnych jest zaburzenie równowagi pomiędzy prozapalnymi limfocytami Th17 a limfocytami regulatorowymi Treg, które wpływają na utrzymanie tolerancji immunologicznej. Limfocyty te są charakteryzowane przez różne czynniki transkrypcyjne i syntezują różne cytokiny. Na równowagę pomiędzy tymi limfocytami wpływają modyfikacje epigenetyczne. Do czynników wpływających na posttranskrypcyjną ekspresję genów należą mikro RNA.

Mikro RNA (miRNA) są to jednoniciowe niekodujące endogenne cząsteczki mRNA, długości średnio 22 nukleotydów. Należą one do najważniejszych cząsteczek regulujących ekspresję genów. Wpływają na regulację ekspresji ok 30% genomu ludzkiego. Dysregulacja ekspresji miRNA jest związana z nasileniem sygnalizacji szlaków zapalnych, wydzielaniem cytokin prozapalnych oraz z procesami autoimmunizacji. MiRNA biorą udział w regulacji odporności wrodzonej oraz nabytej i pełnią istotną rolę w patogenezie procesów autoimmunologicznych.

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej Tomasz Kmiołek podjął się tego aktualnego tematu badawczego. Autor postawił sobie za cel przeanalizowanie roli mikroRNA w regulacji syntezy czynników transkrypcyjnych oraz ich wpływu na zaburzeniu równowagi pomiędzy komórkami prozapalnymi Th17 oraz regulatorowymi Treg u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów.

Praca powstała w Zakładzie Biologii Molekularnej Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Paradowskiej-Goryckiej. Badania były finansowane w ramach grantu prof. dr hab. n. med. Agnieszki Paradowskiej-Goryckiej o numerze 2015/B/NZ5/00247 pod tytułem: Analiza wewnątrzkomórkowych i wolno-krażących microRNA związanych z równowagą komórek Treg i Th17 u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS).

Rozprawa doktorska została przygotowana na podstawie spójnego tematycznie cyklu trzech opublikowanych w międzynarodowych czasopismach artykułów na temat roli mikroRNA w patogenezie RZS i ich znaczenia w zaburzeniach równowagi pomiędzy limfocytami Th 17 a Treg. Łączny Impact Factor tych artykułów wynosi 22,66.

1. Kmiołek 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: 6.208, Punktacja MNiSW: 140

2. Paradowska-Gorycka A.; Wajda A.; Romanowska-Próchnicka K.; Walczuk E.; Kuca-Warnawin E.; Kmiołek 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: 8,786, Punktacja MNiSW: 140

3. Kmiołek T.; Paradowska-Gorycka A. miRNAs as Biomarkers and Possible Therapeutic Strategies in Rheumatoid Arthritis. *Cells* 2022, 11, 452

Impact Factor: 7,666, Punktacja MNiSW: 140

Rozprawa doktorska ma układ typowy, zawiera wszystkie wymagane merytorycznie części, obejmuje 69 stron maszynopisu, 135 pozycji prawidłowo dobranego, aktualnego piśmiennictwa. Ponadto zawiera w załącznikach 3 publikacje, wchodzące w skład cyklu tematycznego, oraz odnoszące się do nich tabele i ryciny. Została napisana w przystępny sposób.

We wstępie pracy Doktorant szczegółowo omawia zagadnienia dotyczące patogenezy RZS z uwzględnieniem roli podtypów komórek Th, a zwłaszcza równowagi w zakresie komórek Th17/Treg w przebiegu procesu zapalnego. Ponadto omawia rolę licznych czynników transkrypcyjnych, takich jak STAT3, STAT5, SMAD2, SMAD3, SMAD4, HELIOS, HIF-1A, SOCS1 w inicjacji i hamowaniu reakcji zapalnej. Opisuje także rolę cząsteczek miRNA w epigenetycznej regulacji ekspresji czynników transkrypcyjnych.

Doktorant wykazuje się szeroką wiedzą na temat patogenezy RZS, immunologicznych podstaw procesu zapalnego oraz roli miRNA w przebiegu procesów zapalnych i autoimmunizacyjnych.

Przeprowadzone badania miały następujące cele:

- ocena wpływu wybranych miRNA oraz czynników transkrypcyjnych na równowagę komórek Th17/Treg oraz patogenezę RZS;
- znalezienie wśród badanych czynników transkrypcyjnych i miRNA biomarkerów o potencjale diagnostycznym bądź prognostycznym w celu wczesnego wykrywania RZS;
- lepsze zrozumienie wpływu miRNA na regulację czynników transkrypcyjnych istotnych w równowadze komórek Th17/Treg.

Do badań zakwalifikowano 45 chorych na RZS oraz jako grupy kontrolne 27 chorych na chorobę zwyrodnieniową stawów (OA) oraz 46 osób zdrowych (HC). W tych grupach badano profil cytokin oraz ekspresje czynników transkrypcyjnych we krwi. Analiza poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych w komórkach Th17/Treg została przeprowadzona na grupie 15 chorych z RZS, 15 z OA oraz 15 HC. Poziom ekspresji miRNA w komórkach Th17 i Treg określono u 15 osób z RZS, 11 – z OA i 15 HC.

W grupie badanej, spełniającej kryteria klasyfikacyjne RZS ACR z 2010, określono parametry kliniczne, m.in. aktywność choroby ocenianą wskaźnikiem DAS28, oraz parametry laboratoryjne takie jak OB, CRP, RF i anty-CCP. Brano także pod uwagę stosowane leczenie immunosupresyjne z uwzględnieniem klasycznych leków modyfikujących przebieg choroby oraz leków biologicznych.

W badanych grupach przeprowadzono analizę komórek Th17 i Treg we krwi obwodowej za pomocą cytometrii przepływową. Wyizolowano RNA z krwi obwodowej oraz z komórek Th17 i Treg. Określono ekspresję genów następujących czynników transkrypcyjnych: FOXP3, RORc, SMAD2, SMAD3, SMAD4, STAT3, STAT5A, HIF-1A, SOCS1, HELIOS, stosując metodę ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Analizowano również ekspresję wybranych miRNA: miR-24, miR-26a, miR-31, miR-100, miR-126, miR-146a, miR-155 i miR-326. Ponadto oznaczono w surowicy poziom następujących cytokin: IL-17A, IL-17F, IL-10, IL-23, IL-21, IL-22, IFN γ , IL-35 oraz IL-6.

Część eksperymentalna pracy została prawidłowo zaplanowana i wykonana. Doktorant wykazał się bardzo dobrym warsztatem badawczym, stosując nowoczesne metody biologii molekularnej.

Uzyskane wyniki zostały jasno sformułowane i przedstawione w tabelach i na rycinach dołączonych do 3 publikacji stanowiących cykl tematyczny.

Najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań:

- u chorych na RZS odsetek komórek Treg był istotnie niższy niż u pacjentów z OA i HC, a proporcje komórek Th17 były wyższe w RZS i OA;
- u chorych na RZS liczba kom Th17 była kilkakrotnie wyższa niż komórek Treg, natomiast u chorych z OA i HC komórki Th17 występowały tylko do 1,5 – 2 razy częściej niż Treg;
- czynnik STAT5 wykazywał wyższą ekspresję u chorych z RZS w porównaniu do HC;
- analiza ekspresji czynników transkrypcyjnych we krwi pełnej i kom Th17 i Treg wykazała, co następuje:

- w komórkach Th17 nie wykryto ekspresji genów *STAT5* i *HELIOS*
 - zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy *SMAD3* i *STAT3* u chorych na RZS, oraz negatywną pomiędzy *HIF-1A* i *SMAD2* w komórkach Treg u chorych na RZS
- ekspresja w krwi obwodowej *IL-17* i *IL-21* była wyższa u pacjentów z RZS niż z OA;
- ekspresja *IL-2* i *IFN-γ* była wyższa u chorych na RZS i OA niż w HC;
- kombinacja *HIF-1A*, *SMAD3* i *STAT3* ma potencjał diagnostyczny do odróżnienia RZS od HC, natomiast kombinacja *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4* i *STAT3* do odróżnienia RZS od OA;
- wykazano pozytywną korelację ekspresji w komórkach Treg u chorych na RZS między miR-26 i *SOCS1*, miR-31 i *SMAD3*, miR-155 i *SMAD3*, *SMAD4*,
- wykazano pozytywną korelację w komórkach Th17 między miR-26 i *SMAD3*, *STAT3*, *SOCS1*, miR-155 i *STAT3*,
- stwierdzono negatywną korelację pomiędzy między miR-26, miR-126 i *STAT5A* w komórkach Treg w RZS.
- zaobserwowano wyższą ekspresję miR-31 w Th17 u pacjentów z RZS o niskim wskaźniku aktywności DAS-28 oraz wyższy poziom ekspresji miR-24 w komórkach Treg dla pacjentów o wysokim DAS-28;
- wykazano, że poziom ekspresji miR-146a w komórkach Treg jest wyższy u pacjentów z wysokim mianem RF;
- pacjenci z obecnymi przeciwciałami anty-CCP mają niższy poziom ekspresji miR-31 w komórkach Treg niż z pacjenci bez przeciwciał anty-CCP.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań autor sformułował 3 końcowe wnioski:

1. *SMAD3* i *STAT3* mają największy potencjał diagnostyczny w klasyfikacji pacjentów z RZS.
2. miR-146a pełni istotną rolę jako czynnik przeciwzapalny. Zmniejszenie ekspresji miR-146a w komórkach Treg może promować ich proliferację i łagodzić proces zapalny.
3. Spośród badanych miRNA największy potencjał jako biomarkery diagnostyczne wykazały miR-26 oraz miR-155, które pozwalały na odróżnienie RZS od HC. Kombinacja obu miRNA ma większy potencjał diagnostyczny, niż każde z nich z osobna.

Opis uzyskanych wyników oraz ich dyskusja zostały przeprowadzone w sposób poprawny, w oparciu o aktualne piśmiennictwo. W dyskusji, która obejmuje 8 stron rozprawy, Autor wyczerpująco omawia wyniki własnych badań w świetle danych literaturowych i opatruje je odpowiednim komentarzem.

Pod względem edytorskim: praca jest starannie przygotowana, prawidłowo zredagowana, poprawna pod względem formalnym, językowym i stylistycznym, zawiera przejrzyste ryciny i tabele.

Uważam, że rozprawa ta jest bardzo ciekawa i nowatorska, wnosi duży wkład w obecną wiedzę dotyczącą patogenezy RZS. Hipoteza badawcza i cele pracy zostały

odpowiednio sformułowane, a badania zostały przeprowadzone w sposób prawidłowy i pozwoliły na uzyskanie odpowiedzi na postawione pytania.

Zaletą pracy jest przeprowadzenie bardzo szerokiej analizy czynników transkrypcyjnych oraz miRNA z zastosowaniem zaawansowanych technologii laboratoryjnych i ich porównanie w grupach chorych na RZS, OA oraz osób zdrowych. Istotne jest porównanie ekspresji tych czynników zarówno we krwi pełnej jak i w komórkach Treg i Th17 oraz odniesienie uzyskanych wyników do panelu cytokin pro- i przeciwzapalnych. Cenne jest również poszukiwanie korelacji między badanymi cząsteczkami a parametrami klinicznymi i stosowanym leczeniem.

Podjęte przez Doktoranta badania są istotne dla zrozumienia patogenezы RZS i właściwego planowania terapii. Badania te powinny być kontynuowane. Celowe jest przeprowadzenie ich na większej grupie chorych z uwzględnieniem różnych metod terapeutycznych. Poza tym ciekawe wydaje się przeprowadzenie tych badań z wykorzystaniem do porównania w grupie kontrolnej osób z innymi typami zapalenia stawów, np. ZZSK.

W nawiązaniu do przedstawionej rozprawy interesuje mnie:

- czy analiza czynników transkrypcyjnych oraz miRNA u poszczególnych chorych może mieć znaczenie w planowaniu terapii, a zwłaszcza czy pozwoli na odpowiedni dobór leków biologicznych;

- czy ingerencja w modyfikacje epigenetyczne poprzez pewne wybrane miRNA może prowadzić do skutecznej terapii RZS? Jakie są ograniczenia takiej terapii?

- czy i w jaki sposób możliwa jest ingerencja terapeutyczna celem przywrócenia równowagi między Th17 a Treg u chorych na RZS?

Rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny i spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz 1668). W związku z powyższym składam przed Wysoką Radą Naukową Narodowego Instytutu Geriatrii, Reumatologii i Rehabilitacji wniosek o dopuszczenie mgr inż. Tomasza Kmiołka 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.



Dr hab. n. med. Magdalena Szmyrka

Wrocław, 09.06.2024

