

Warszawa, 15.02.2026 r.

Ocena rozprawy doktorskiej lek. Mikołaja Radziszewskiego pt.:

*"Zaburzenia metylacji całego genomu w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej
u pacjentów z orbitopatią tarczycową w przebiegu choroby Gravesa i Basedowa,
w trakcie leczenia dożylnymi pulsami glikokortykosteroidów"*

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została zrealizowana w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Tomasza Bednarczuka.

Choroba Gravesa i Basedowa (GD) jest autoimmunologiczną chorobą wywołaną przez autoprzeciwciała skierowane przeciwko receptorowi TSH (TSHR), które stymulują tarczycę, prowadząc do jej nadczynności wydzielniczej i przerostu. Etiopatogeneza i obraz kliniczny GD wynikają z interakcji licznych czynników genetycznych, środowiskowych i endogennych. Do najlepiej poznanych czynników związanych z nasileniem nadczynności tarczycy należą: młodszy wiek, wysokie stężenie przeciwciał anti-TSHR (TRAb), podwyższone poziomy wolnych hormonów tarczycy (tyroksyny i trijodotyroniny) oraz obecność wola. Terapia choroby obejmuje leki przeciwtarczycowe (tyreostatyki) oraz leczenie radykalne, takie jak terapia radiojodem lub tyreidektomia, i charakteryzuje się stosunkowo wysokim odsetkiem niepowodzeń i nawrotów, szczególnie w grupie dzieci.

Najczęstszą pozatarczycową manifestacją choroby Gravesa-Basedowa jest orbitopatia tarczycowa, stanowiąca zespół objawów ocznych wynikających z procesów autoimmunizacyjnych zachodzących w obrębie tkanek miękkich oczodołu, która w ciężkich postaciach może prowadzić do utraty wzroku. Występuje ona u około 30% chorych, ujawnia się w różnych fazach choroby i charakteryzuje się dużą heterogennością obrazu klinicznego. Dotychczas wykazano, że rozwój orbitopatii jest silnie związany ze starszym wiekiem

pacjentów, wysokim stężeniem przeciwciał TRAb oraz paleniem papierosów. Leczenie umiarkowanej i ciężkiej aktywnej orbitopatii, stanowiące nadal istotne wyzwanie terapeutyczne, opiera się przede wszystkim na dożylnym podawaniu glikokortykosteroidów w wysokich dawkach. Należy jednak podkreślić, że u części pacjentów odpowiedź na to leczenie jest niezadowalająca.

Czynniki determinujące występowanie, przebieg oraz odpowiedź kliniczną choroby Gravesa i Basedowa oraz towarzyszącej jej orbitopatii tarczycowej pozostają niewystarczająco poznane, przy czym rola procesów epigenetycznych w regulacji ekspresji genów budzi rosnące zainteresowanie. Mechanizmy epigenetyczne, w tym metylacja DNA, stanowią istotne ogniwo łączące czynniki środowiskowe z rozwojem i przebiegiem choroby, wpływając na ekspresję genów bez zmiany sekwencji DNA. Coraz więcej danych wskazuje na udział zaburzeń metylacji DNA w chorobach nowotworowych i autoimmunizacyjnych, w tym w chorobie Gravesa i Basedowa. Wykazano, że chorobie tej towarzyszy hipometylacja DNA, natomiast leczenie tyreostatykami oraz radiojodem wiąże się ze wzrostem stopnia metylacji. Odmienne wzorce metylacji dinukleotydów CpG obserwowano w regionach DNA kodujących czynniki kluczowe dla patofizjologii choroby Gravesa i Basedowa oraz towarzyszącej jej orbitopatii tarczycowej, a palenie tytoniu może dodatkowo modulować globalny status metylacji DNA.

Autor podjął się realizacji ambitnych projektów badawczych, których celem było: (i) zbadanie całogenomowej metylacji DNA u chorych z orbitopatią tarczycową leczonych pulsami metyloprednizolonu zgodnie z protokołem Europejskiej Grupy ds. Orbitopatii Tarczycowej (EUGOGO; Projekt nr 1) oraz (ii) porównanie wzorców całogenomowej metylacji DNA u dorosłych i dzieci ze świeżo rozpoznaną chorobą Gravesa i Basedowa (Projekt nr 2). Przeprowadzone badania były finansowane ze środków przyznanych przez: (i) Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM-20 (Projekt nr 1, projekt główny) oraz (ii) Warszawski Uniwersytet Medyczny w ramach konkursu Projekty Młodych Badaczy.

Rozprawa doktorska lek. Mikołaja Radziszewskiego, licząca 150 stron, ma typowy układ i składa się ze Spisu tabel i rycin, Wykazu stosowanych skrótów, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wstępu, Założeń i celu pracy, Materiałów i Metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków

i Piśmiennictwa. Jako załącznik przedstawiono kopię opinii Komisji Bioetycznej. Rozprawa zawiera 14 tabel oraz 38 rycin.

We Wstępie przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczący choroby Gravesa i Basedowa, obejmujący jej epidemiologię, etiopatogenezę, obraz kliniczny oraz metody leczenia. W związku z tematyką przeprowadzonych badań zaprezentowano również rozszerzony opis roli mechanizmów epigenetycznych w patogenezie i przebiegu choroby, ze szczególnym uwzględnieniem zaburzeń metylacji DNA. Wstęp rozprawy, oparty na wnikliwej analizie 139 artykułów naukowych, wskazuje na rozległą wiedzę Kandydata w zakresie podejmowanej problematyki badawczej. Dodatkowym atutem tej części pracy są tabele, które w przejrzysty sposób podsumowują dotychczasowe badania dotyczące metylacji DNA w chorobie Gravesa i Basedowa (Tabela 1) oraz w orbitopatii tarczycowej (Tabela 2).

Cele pracy zostały przedstawione w sposób właściwy, z wyraźnym rozgraniczeniem celów dotyczących obu realizowanych projektów. Jedynie w części opisującej założenia projektu zabrakło jednoznacznego sformułowania hipotez badawczych.

W sekcji Materiały i Metody przedstawiono wszystkie wymagane informacje dotyczące rekrutacji pacjentów oraz kryteriów włączenia i wykluczenia do badań w projekcie nr 1 i 2. Opis ten uzupełniono o przejrzysty schemat liczebności poszczególnych grup (Rycina 2) oraz protokoły postępowania z pacjentami. Zaprezentowano również kolejne etapy pracy z materiałem biologicznym (krew obwodowa), obejmujące izolację DNA oraz jego dalsze procesowanie w celu przeprowadzenia sekwencjonowania nowej generacji służącego do analizy metylacji DNA, polegającego na selektywnym sekwencjonowaniu regionów bogatych w dinukleotydy CpG po konwersji bisulfitowej DNA (RRBS). Sekcję kończy opis oznaczeń serologicznych oraz zastosowanych analiz bioinformatycznych i statystycznych.

Doktorant przedstawił uzyskane wyniki w tekście oraz w licznych tabelach i rycinach. Wykazał, że u pacjentów z chorobą Gravesa i Basedowa oraz orbitopatią tarczycową istnieją odrębne wzorce metylacji DNA, z przewagą hipometylacji w porównaniu z osobami zdrowymi, zarówno w ujęciu całogenomowym, jak i w obrębie regionów związanych

z procesami immunologicznymi, reakcją zapalną, różnicowaniem oraz wzrostem komórek. U dzieci z GD obserwuje się jedynie pojedyncze różnice w stopniu DNAm na wybranych loci, a ich globalne wzorce metylacji DNA są zbliżone do tych stwierdzanych u dorosłych chorych, którzy nie palą. Wzorce DNAm u dzieci nie różnią się także od obserwowanych u zdrowych rówieśników. Zastosowanie terapii dożylnymi glikokortykosteroidami w aktywnej, umiarkowanej do ciężkiej GO prowadzi do zmian wzorców DNA niezależnie od odpowiedzi klinicznej na leczenie, a u poszczególnych pacjentów obserwuje się także zmiany poziomu DNAm w wybranych loci.

W obszernej, 21-stronicowej Dyskusji Kandydat wnikliwie przeanalizował wszystkie uzyskane wyniki. Na szczególne wyróżnienie zasługuje dojrzała i krytyczna ocena ograniczeń realizowanych projektów, wynikających z heterogenności badanych grup, rodzaju materiału biologicznego wykorzystanego do izolacji DNA (krew obwodowa) oraz metody oceny metylacji DNA zastosowanej w badaniach (analiza RRBS). Sformułowane wnioski są poprawne i logicznie uzasadnione.

Pod względem edytorskim, należy ujednolicić zapis nazw genów zgodnie z aktualnymi wytycznymi HGNC, np. „*TSHR*” zamiast „*TSH-R*” (str. 33, 35 (Ryc. 1), etc.), czy „*TNF*” zamiast „*TNF-alfa*” (str. 43, 48, etc.). Przygotowując ryciny do publikacji, sugerowałabym stosowanie wyłącznie czcionki bezszeryfowej oraz zwiększenie jej wielkości, co istotnie poprawi ich czytelność (uwaga ta odnosi się w szczególności do rycin prezentujących wyniki analiz bioinformatycznych). Na rycinach prezentujących analizy porównawcze głównych komponentów składowych (PCA; Ryciny 9, 16, 20C, 23, 28, 33) należy również zmienić oznaczenie graficzne (w ramce obok wykresu) definiujące jedną z grup symbolem pomarańczowego trójkąta (poprawny układ zaprezentowano na Ryc. 19). Ponadto, w pierwszej linii tekstu na stronie 65 należy zastąpić „Rycina 9” zapisem „Rycina 8”, natomiast na stronie 84 należy zmienić zapis „(Rycina A–D)” na „(Rycina 20A–D)”. Powyższe uwagi nie wpływają na ogólnie bardzo wysoką wartość merytoryczną pracy.

Prosiłabym o odniesienie się do następujących pytań:

1. Jakie testy statystyczne zastosowano do oceny normalności rozkładów?
2. Jakie kryteria przyjęto przy wyborze istotnych statystycznie regionów różnicowo metylowanych (DMRs) zaprezentowanych w Tabelach 4 oraz 9-11, a także szlaków wzbogacenia funkcjonalnego dla nukleotydów CpG (Tabele 6, 7 oraz 12, 13)?
3. Jakie mogą być potencjalne praktyczne zastosowania analiz metylacji DNA w praktyce klinicznej w kontekście choroby Gravesa i Basedowa i orbitopatii tarczycowej?

Podsumowując, chciałabym podkreślić oryginalność rozprawy doktorskiej. Powyższe badania, wykorzystujące nowoczesne metody biologii molekularnej, stanowią istotny wkład w pogłębianie wiedzy na temat molekularnego podłoża choroby Gravesa-Basedowa. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że niniejsza rozprawa doktorska została zrealizowana dzięki m.in. dofinansowaniu uzyskanemu w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki w konkursie Preludium. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1688). W związku z tym, zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Mikołaja Radziszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto dysertację doktorską lek. Mikołaja Radziszewskiego oceniam bardzo wysoko i uważam, że wyniki rozprawy zostaną opublikowane w czasopiśmie o wysokim wskaźniku cytowań (IF), w związku z tym wnioskuję o jej wyróżnienie.



Signed by /
Podpisano przez:
Marlena
Godlewska
Date / Data:
2026-02-15 18:39