

Zakład Genetyki Klinicznej i Molekularnej

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowy Instytut Badawczy

Oddział w Gliwicach,

44-102 Gliwice, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15

Recenzja rozprawy doktorskiej

lek. Mikołaja Radziszewskiego pt.:

„Zaburzenia metylacji całogenomowej w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u pacjentów z orbitopatią tarczycową w przebiegu choroby Gravesa i Basedowa i leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami.”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została zrealizowana w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod promotorstwem prof. dr. hab. n.med. Tomasza Bednarczuka.

1. Ocena formalna rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska ma formę dysertacji przedstawiającej założenia oraz wyniki uzyskane w dwóch projektach:

Projekt 1 – „Zaburzenia metylacji genomowej w komórkach krwi obwodowej u pacjentów z chorobą Gravesa i Basedowa oraz orbitopatią tarczycową w trakcie leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami”, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, Grant Preludium-20: NCN57, 2021/41/N/NZ5/C2975

Projekt 2 – „Zaburzenia metylacji całogenomowej w komórkach krwi obwodowej u osób dorosłych i dzieci z chorobą Gravesa i Basedowa” finansowanego w ramach Grantu Młodego Badacza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego: 1WN/M/MB/N/20.

W mojej ocenie warto jest podkreślenie faktu, że w obu projektach kierownikiem jest lek. Mikołaj Radziszewski.

Rozprawa prezentuje układ typowy dla dysertacji, liczy 150 stron, składa się z 12 szczegółowych rozdziałów obejmujących wstęp, cel pracy doktorskiej, opis grup badawczych, zastosowane materiały i metody, uzyskane wyniki, podsumowanie obu projektów, dyskusję, wnioski oraz literaturę. Właściwy tekst jest uzupełniony wykazem 34 rycin oraz 14 tabel. Piśmiennictwo obejmuje 232 referencje literaturowe, wśród których dominują prace autorów zagranicznych. Dobór piśmiennictwa i jego aktualność są adekwatne do tematu rozprawy doktorskiej. Przedłożona dysertacja jest starannie przygotowana i w przejrzystym układzie. Praca zawiera dokładny spis zastosowanych skrótów oraz spełnia wszystkie formalnie wymagane elementy dla dysertacji doktorskiej wraz z pozytywną opinią Komisji Bioetycznej dotyczącą wykonanych badań.

Pomimo powyższych wymienionych zalet dysertacji doktorant nie uniknął skrótów myślowych i kolokwializmów, np. „chorzy dorośli i dzieci z GD różnili się istotnie na poziomie pojedynczych CpG”, gdzie prawidłowy opis powinien odnosić się do różnic w metylacji DNA chorych dorosłych i pediatrycznych. Innym przykładem jest zdanie: „W pracach kilku autorów poświęconych m.in. wariantom genów białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału immunologicznego...”. Powinno być „W pracach związanych z oceną wpływu wariantów genowych kodujących białka...”. Podobnym przykładem jest zdanie: „Pierwszy z nich jest procesem skutkującym nieobecnością ekspresji genów jednego z chromosomów X w organizmie, ograniczając tym samym ilość kopii genów...” gdzie zamiast słowa „organizmie” należałoby użyć słowa „komórce”. Również skrót myślowy został zaprezentowany w zdaniu: „W odchyleniach laboratoryjnych...” powinien być zastąpiony zdaniem: „W odchyleniach wyników badań laboratoryjnych...”. Ciekawi mnie również określenie „analizie eksploracyjnej” w odniesieniu do standardowo stosowanej analizy oraz stwierdzenie „zniuansowanych, złożonych mechanizmach epigenetycznych” jako opisu przyłączania grup alkilowych (metylowych) do zasad azotowych nukleotydów DNA. Zwracam również uwagę, że prawidłowy zapis ludzkich genów to duża litera zapisana kursywą, a ludzkie białko zapisuje się dużą literą i prostą czcionką. Zdarza się, że ta zasada nie jest stosowana w przedstawionej dysertacji. Proponuję również przeredagować ostatnie zdanie ze streszczenia w języku polskim: „Z uwagi obecny stan wiedzy dotyczący natury procesu powstawania DNAm, jej zmienności i możliwej dwustronnej zależności od czynników genetycznych, endogennych i środowiskowych (szczególnie nikotynizmu), a także specyfiki oceny DNAm we wszystkich leukocytach krwi

obwodowej oraz heterogenności obrazu klinicznego GO i GD, konieczne są kolejne, uzupełniające badania w tym polu". Złożoność tego zdania jest nieadekwatna do przekazu i nie wpływa na lepsze zrozumienie wyników. Podobna ocena dotyczy zdania: "W pracach kilku autorów wskazano również związek DNAm i GO, w tym w kontekście analizy wzbogacenia funkcjonalnego i ujęcia klinicznego". W mojej ocenie zdanie będzie bardziej zrozumiałe w prostszej formie: „W innych pracach wykazano związek DNAm i GO w kontekście analizy funkcjonalnej i cech klinicznych”, jak również bardziej zrozumiałe jest stosowanie zwyczajowo stosowanego określenia „analiza funkcjonalna” bez dodania imiesłowa przymiotnikowego biernego „wzbogacana”. Kolokwializmy wkrały się również do opisu wyników: „W analizie globalnego profilu DNAm w grupie wszystkich chorych z GO (n=24) i zdrowych kontroli dorosłych (HC, n=7) wykazano hipometylację GO” z naciskiem na dwa ostatnie słowa. Innym przykładem jest określenie: „zbyt niski input DNA” z naciskiem na słowo „input”. W przypadku stosowania uproszczeń warto opisać w tekście, jakie uproszczenia, akronimy lub inne określenia będą stosowane w opisie, aby ułatwić czytanie wyników. Dodatkowo chciałabym podkreślić, że w języku polskim pacjenci chorują „na” chorobę lub chorobę się rozpoznaje u pacjenta, choroba nie jest „z” pacjentem. Również warto pamiętać, że DNA jest rodzaju męskiego (ten DNA = ten kwas deoksyrybonukleotydowy), czyli należy pisać „odmienny DNAm”, a nie „odmiennej DNAm”.

Zdaje sobie sprawę, że w języku polskim opisy w zakresie stosowanych technik badawczych czy procesów molekularnych mogą wydawać się ubogie w słownictwo lub nieatrakcyjne czytelniczo ze względu na często stosowane powtórzenia tych samych słów. Uważam jednak, że w języku naukowym nie należy obawiać się utraty walorów dotyczących stylistyki i plastyczności języka na rzecz zachowania jego prostoty, fachowości oraz jasnego i ścisłego opisu faktów. Chciałabym również dodać, że powyższe przykłady nie umniejszają wartości merytorycznej przedłożonej rozprawy doktorskiej, i są jedynie refleksją recenzenta oraz wskazówką, którą doktorant może wziąć pod uwagę przy opisywaniu wyników podczas przygotowywania publikacji.

2. Ocena merytoryczna pracy doktorskiej.

Wstęp poprzedzający właściwą część pracy doktorskiej jest obszerny i zawiera 13 podrozdziałów, które opisują szczegółowo aspekty genetyczne, kliniczne i środowiskowe wpływające na rozwój i fenotyp pacjentów z rozpoznaną chorobą Gravesa-Basedowa. Znaczną

część wstępu zajmuje opis procesu metylacji i jego znaczenia w chorobie Gravesa-Basedowa oraz orbitopatii tarczycowej, uzupełniony o najważniejsze wnioski z przeglądu literatury przedstawione w formie tabel. Osobnym podrozdziałem jest podsumowanie dotychczasowej wiedzy dotyczącej wpływu zastosowania glikokortykosteroidów na profil metylacji DNA. Część monografii dotycząca wstępu dowodzi dużej wiedzy i odczytania doktoranta w tematyce realizowanej w pracy doktorskiej. W mojej ocenie, jako że praca dotyczy oceny profilu metylacji całego genomu, zabrakło krótkiej informacji o metodach stosowanych w tym zakresie. Może warto poświęcić jedno przezrocze podczas obrony na przedstawienie dostępnych metod, jakie mają zalety i wady (w szczególności jak mogą wpływać na uzyskiwane wyniki), oraz wyjaśnienie, dlaczego doktorant zdecydował się na metodę wykorzystywaną w niniejszej pracy.

W rozdziale VI „Założenia i cel pracy” zostały przedstawione cele projektów, które uwzględniono w rozprawie doktorskiej. W mojej ocenie w tym rozdziale powinien znaleźć się cel pracy doktorskiej, do którego realizacji posłużyły dwa projekty, nie odwrotnie. Rozumiem, że projekty posłużyły do zbadania postawionej hipotezy i że praca doktorska nie jest streszczeniem projektów. Z tego względu proszę doktoranta o postawienie hipotezy badawczej realizowanej w niniejszej pracy doktorskiej podczas obrony pracy doktorskiej.

Chciałabym również zauważyć, że ocena metylacji DNA jest metodą, która posłużyła do sprawdzenia postawionego pytania, tak więc brakuje jasno zarysowanego celu wykonania obu projektów. Jeżeli celem było wyselekcjonowanie istotnych biomarkerów metylowania DNA mogących wyjaśnić rozwijającą się orbitopatię tarczycową lub poszukiwanie biomarkerów metylacyjnych mogących pomóc w ocenie skuteczności zastosowanego leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami, należy to sprecyzować.

W rozdziale VII.1 przedstawiono liczbę pacjentów. Ze względu na zaplanowanie wielu porównań wielu grup, ostatecznie grupy nie są liczne i wynoszą od 6 do 14 pacjentów, z możliwym ograniczeniem części porównań, i wtedy liczebność dwóch grup wzrasta do 20 i 26 pacjentów. Dobrze porządkuje liczebności i podział na grupy rycina nr 2. Proszę doktoranta o komentarz dotyczący liczebności i istotności statystycznych porównań dla zaproponowanych liczebności grup. Częściowo jest to podnoszone w dyskusji, ale ciekawa jestem opinii doktoranta dotyczącej dalszej kontynuacji badań. W następnych rozdziałach przedstawiono wykorzystaną metodę oceny metylacji DNA oraz analizy bioinformatyczne i statystyczne. W tym punkcie chciałabym dodać, że plik fastQ nie jest sam w sobie plikiem oceniającym jakość

sekwencjonowania, ale jest plikiem wyjściowym, który można zaimportować do oprogramowania w celu wykonania analizy, w tym jakościowej.

W rozdziale VII.3.2. „Analiza statystyczna” opisano zastosowane oprogramowanie oraz testy statystyczne. W tym punkcie chciałabym zaproponować doktorantowi stosowanie pojęcia „grupy badanej” zamiast słowa „przypadków”.

Przechodząc do rozdziału VIII „Wyniki”, proszę doktoranta o ocenę, czy charakterystyka pacjentów włączonych do projektów jest wynikiem czy opisem grupy zakwalifikowanej do badania. Pierwsza część wyników odnosi się do poszukiwania różnic w profilu metylacji w kontekście rozwoju orbitopatii tarczycowej oraz skuteczności leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami.

W opisie wyników zastosowano bardzo dobre ryciny ułatwiające zrozumienie uzyskanych wyników, natomiast opis wyników nie zawsze jest jednoznaczny i łatwy do zrozumienia, np.: „W analizie głównych komponentów składowych (PCA) wykazano wyraźne grupowanie próbek GO i HC (Rycina 9).” Zgodnie z ryciną nr 9, próbki „GO” i próbki „HC” grupują się w dwa odrębne, nie nakładające się zbiory. Dwie próbki z grupy opisanej jako „GO-P1” grupują się razem z „GO”. Czy doktorant może przedstawić hipotezę mogącą wyjaśnić ich odrębność?

W dalszej części wyników związanych z „Projektem 1” zostały wyspecyfikowane istotne statystycznie pod względem wzoru metylacji CpG z podziałem na regiony. Podano również 108 najważniejszych i zróżnicowanych funkcjonalnie oraz klinicznie pseudogenów/genów. Jaką metodą zastosowano do selekcji najważniejszych pseudogenów/genów i jakie jest zdanie doktoranta dotyczące wyselekcjonowanych pseudogenów? Wprawdzie wątek ten jest poruszony w dyskusji jako rosnącej istotności pseudogenów, w szczególności w nowotworach o charakterze guzów litych, jednakże bez podjęcia próby wyjaśnienia, jakie mogą mieć znaczenie w kontekście uzyskanych wyników przez doktoranta. Czy pseudogeny mogą pełnić rolę regulatorową, wpływającą na ekspresję genów, przez co zaburzenie ich wzoru metylacyjnego mogłoby przekładać się na ekspresję genów bez wykrywania zmian w samej sekwencji tych genów?

Analiza wzoru metylacji DNA germinального pacjentów w zależności od odpowiedzi na leczenie ivGCS nie wykazała istotnych różnic między grupą pacjentów, która odpowiedziała na leczenie, a grupą pacjentów, która nie odpowiedziała na leczenie, dlatego doktorant zdecydował się

ocenić profil metylacji DNA germinального przed i po leczeniu dla każdego pacjenta indywidualnie. W pracy wyselekcjonowano szeroki zbiór loci o zmienionej metylacji w indywidualnej ocenie. Z tego też powodu powstaje pytanie, czy tak duża różnica we wzorze metylacji DNA poszczególnego pacjenta bez istotnych różnic dla całych grup jest efektem zastosowania leczenia czy innych czynników? Czy ocena wzoru metylacji DNA każdego pacjenta powinna być wykonana co najmniej z trzech niezależnych próbek krwi, aby ocenić, czy istnieją różnice między poszczególnymi badaniami? Czy na zmianę wzoru metylacji indywidualnie ocenianej mogą mieć wpływ inne czynniki, takie jak płeć, dieta, dym papierosowy, inne leki?

W drugiej części wyników dotyczącej realizacji drugiego projektu wykazano odrębne wzory metylacji DNA dorosłych chorych na Graves-Basedowa (GB) w porównaniu z grupą kontrolną. W analizie nienadzorowanej głównych składowych PCA uwidoczniło się wyraźnie dwie grupy: chorzy na GB oraz zdrowi. Interesujące jest uwidocznienie dwóch podgrup w ramach grupy chorych, co również jest wartością skomentowaną przez doktoranta.

Ocena wzorca profilu metylacji DNA pediatrycznych pacjentów chorych na GB i dzieci zdrowych wykazała hipermetylację DNA pacjentów przy jednoczesnym wskazaniu na „chaotyczność” profilu metylacji. W mojej ocenie profil metylacji DNA pediatrycznych pacjentów nie wykazuje jednoznacznego, łatwego do zaprezentowania wzorca, ale nie użyłabym słowa „chaotycznego”. Potwierdza to analiza głównych składowych (PCA), w której wszystkie profile metylacyjne DNA germinального grupują się jednak razem. Dodatkowo w ocenie wzoru metylacji DNA germinального pacjentów pediatrycznych wyselekcjonowano 18 CpG z 350024 odmiennie zmetylowanych regionów, co wydaje się być nieporównywalnie małą ilością do liczby zmienionych regionów. Jakie jest zdanie doktoranta w tej kwestii?

Ciekawym wynikiem przedstawionym w rozdziale VIII.2.2.3. „Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a wiekiem rozwoju Choroby Gravesa i Basedowa” jest uwidocznienie podobieństw między metylacją DNA dorosłych niepalących a metylacją DNA pacjentów pediatrycznych, co wskazuje, że palenie papierosów jest bardzo silnym czynnikiem zmieniającym profil metylacji germinального DNA, a wiek nie był istotnym czynnikiem związanym z rozwojem choroby Gravesa-Basedowa. Być może jest to wynik, którego można się było spodziewać, na co pośrednio wskazuje doktorant wielokrotnie wspominając o nikotynizmie jako istotnym czynniku znacząco pogarszającym przebieg choroby Gravesa-Basedowa i zwiększającym ryzyko rozwoju orbitopatii tarczycowej. Nie wykluczone, że

zmiany w profilu metylacji DNA germinálnego niosą za sobą skutki w postaci zmiany profilu ekspresji genów i czynników regulatorowych, co będzie wpływało na ekspresję białek i aktywowanie bądź wyciszenie szlaków sygnałowych komórki. Doktorant podkreślił również. W swojej pracy, że zmiany wzoru metylacji DNA dotyczyły sekwencji DNA kodujących geny związane z procesami immunologicznymi, stanem zapalnym czy też szlakiem odpowiedzi swoistej autoreaktywnych limfocytów CD4+, co może wpływać na rozwój orbitopatii tarczycowej. Ciekawym wydaje się również wynik wskazujący na fakt, że u pacjentów dorosłych i osób zdrowych częściej zmianie wzoru metylacji ulegają regiony promotorowe, natomiast u dzieci w regionach niekodujących. Wynik ten został poddany dyskusji, jednakże w mojej ocenie nie rozwinęto tego wątku zbyt szeroko, a jest to jeden z ciekawszych wniosków, na jakie wskazuje doktorant.

Dyskusja przeprowadzona w pracy jest szeroka i skupia się głównie na opisie zebranych danych literaturowych dotyczących regionów DNA i sekwencji genów, które różnią się wzorem metylacji w poszczególnych grupach pacjentów. Jest to dyskusja potwierdzająca znajomość aktualnej literatury i jest to z pewnością dyskusja, która wymagała dużego nakładu pracy.

Ocena końcowa.

Przedłożona praca wpisuje się w aktualne trendy badań naukowych związanych z poszukiwaniem czynników wpływających na rozwój, przebieg i leczenie choroby Gravesa-Basedowa. Jest znaczącym wkładem w wiedzę dotyczącą wpływu nikotynizmu na zmiany we wzorze metylacji DNA germinálnego oraz różnic w metylacji DNA u pacjentów dorosłych i pediatrycznych chorujących na Gravesa Basedowa. Z obowiązku recenzenta w części opisującej formalny aspekt rozprawy wskazuję na uchybienia stylistyczne, jednakże nie obniżają one wartości merytorycznej i naukowej przedstawionej pracy i uważam, że są jedynie wskazówką w przygotowywaniu manuskryptów.

Rozprawę oceniam pozytywnie, w mojej opinii stanowi dowód biegłej orientacji autora w projektowaniu i przeprowadzaniu badań oraz konstruowaniu wniosków. Praca ta jak i dorobek doktoranta w postaci kierowania dwoma projektami, daje mi możliwość wysnucia wniosku, że pan lek. Mikołaj Radziszewski będzie kontynuował pracę naukową i będzie stawiał sobie nowe cele i wyzwania badawcze.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim i zwracam się do Rady Naukowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie lek. Mikołaja Radziszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.