



Akceptacja
Alm

UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wrocław, 13. 04. 2026

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana lek. med. Mikołaja Radziszewskiego
pt. „Zaburzenia metylacji całogenomowej w komórkach jednojądrzastych krwi
obwodowej u pacjentów z orbitopatią tarczycową w przebiegu choroby Gravesa i Basedowa,
w trakcie leczenia dożylnymi pulsami glikokortykosteroidów”
przygotowana na podstawie decyzji
Rady Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne Pana lek. med. Mikołaja Radziszewskiego jest wynikiem pracy nad czynnikami etiologicznymi, predykcyjnymi, prognostycznymi i monitorującymi leczenie w chorobie Gravesa i Basedowa. Autor podjął się badań z uwagi na niedostateczną wiedzę dotyczącą pochodzenia, patogenezy choroby Gravesa i Basedowa i trudności w jej leczeniu z brakiem czynników predykcyjnych przewidujących efekty leczenia. Celem rozprawy była ocena całogenomowej metylacji DNA komórek krwi obwodowej u pacjentów z chorobą Gravesa i Basedowa. Badania Doktoranta wykonywane były w jednostkach kliniczno-naukowych: Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, we współpracy z Kliniką Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii z Pododdziałem Kardiologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Badania całogenomowej metylacji DNA zostały przeprowadzone w Zakładzie Genetyki Medycznej WUM. Praca doktorska była prowadzona pod kierunkiem promotora – prof. dr hab. n. med. Tomasza Bednarczuka.

Badaniem mechanizmów regulujących ekspresję genów (transkrypcję) zajmuje się epigenetyka (gr. przedrostek *epi* – poza czymś, zewnętrzny + *genesis* – pochodzenie). Sam termin został wprowadzony w latach 40. XX wieku przez Conrada Hala Waddingtona, zwolennika koncepcji epigenety, dla opisanego procesów, które zachodzą w trakcie rozwoju organizmu według ściśle określonego planu, regulowanego przy udziale związków chemicznych. Późniejsze badania udowodniły, że taki plan rozwoju rzeczywiście istnieje, a jego efektem jest powstanie organizmu, w którym poszczególne komórki o określonej morfologii pełnią specyficzne funkcje, niezbędne dla prawidłowego jego funkcjonowania jako całości. Każda z tych komórek zawiera taką samą informację genetyczną w postaci DNA, zaś dla procesu różnicowania się komórek ważna jest ekspresja ściśle określonych genów w konkretnym momencie rozwoju organizmu. W kontekście tej wiedzy zmieniło się też znaczenie terminu epigenetyka – nie jest on ograniczony jedynie do badań procesu epigenety, lecz dotyczy szerszego zagadnienia, jakim jest regulacja ekspresji genów na wszystkich etapach rozwoju i funkcjonowania organizmu. Postulowane są formy dziedziczenia metylomu, jednak całościowo jej wzorce ulegają bieżącym zmianom w ciągu życia, pod wpływem środowiska zewnętrznego.

Jednym z lepiej poznanych mechanizmów regulacji epigenetycznej jest metylacja DNA, polegająca na przyłączeniu do cytozyny reszty metylowej. Reakcja metylacji przebiega przy udziale enzymów z grupy metylotransferaz DNA, zaś donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina. Metylowane cytozyny zlokalizowane są w obrębie tzw. wysp CpG – fragmentów DNA zawierających ułożone palindromicznie sekwencje CG, zazwyczaj zlokalizowane w regionach promotorowych. Metylacja DNA w tych regionach prowadzi do zahamowania ekspresji genu poprzez zablokowanie możliwości przyłączenia się czynników transkrypcyjnych/białek wzmacniających ekspresję genu lub poprzez wiązanie białek rozpoznających metylowane sekwencje DNA, co stanowi sygnał do agregacji kompleksu represorowego.

Również w modelu choroby wieloczynnikowej, wpływ czynników epigenetycznych, genetycznych i środowiskowych komplikuje zrozumienie ujawnienia się choroby, jej przebieg i odpowiedź kliniczną na zastosowane leczenie. W literaturze dostępne są obecnie wstępne doniesienia dotyczące zaburzeń metylacji DNA komórek krwi obwodowej w chorobach autoimmunizacyjnych. Opisuje się zmienność procesu metylacji w chorobie Gravesa i Basedowa oraz po przeprowadzeniu leczenia tyreostatykami oraz radiojodem oraz odmienną zmetylowanych dinukleotydów CpG w regionach cytokin prozapalnych, cząsteczek adhezyjnych i uczestniczących w przekazaniu drugiego sygnału podczas prezentacji antygeny – ważnych elementów patofizjologicznych chorób autoimmunizacyjnych. W literaturze wykazuje się też związek zaburzeń metylacji DNA z nikotynizmem, co może mieć kluczowe znaczenie dla patofizjologii omawianych w rozprawie doktorskiej schorzeń tarczycy.

Choroba Gravesa i Basedowa jest autoimmunizacyjną chorobą tarczycy, prowadzącą do nadczynności gruczołu. Choroba jest uwarunkowana wieloma czynnikami: genetycznymi i śro-

dowiskowymi, ale także endogennymi. Jednocześnie, poznane czynniki genetyczne odpowiadają jedynie za ok. 10% spodziewanej podatności na zachorowanie, a zarówno kliniczne i genetyczne determinanty powodzenia leczenia choroby Gravesa i Basedowa pozostają nieznane. Terapia choroby Gravesa i Basedowa obejmuje leki przeciwtarczycowe oraz leczenie radykalne i charakteryzuje się dużym odsetkiem niepowodzenia i nawrotu choroby, szczególnie w grupie dzieci. Jednym z fenotypów choroby Gravesa i Basedowa jest orbitopatia tarczycowa będąca najczęstszą pozatarczycową manifestacją tej choroby. Orbitopatia tarczycowa jest zespołem objawów ocznych wtórnych do procesów autoimmunizacyjnych w obrębie tkanek miękkich oczodołu, mogąca prowadzić do utraty wzroku. Występuje u ok. 30% chorych, ujawnia się w różnym czasie i jest heterogenna i związana z nikotynizmem. W terapii orbitopatii tarczycowej kluczowe znaczenie, poza zaprzestaniem palenia, mają dożylny puls glikokortykosteroidów oraz leczenie biologiczne. Jednak wpływ leków na proces leczenia jest zmienny i prawdopodobnie powiązany ze zmianami epigenetycznymi.

Powyższe uwagi dowodzą słuszności podjętego tematu przez Doktoranta.

Ocena pracy doktorskiej:

Ocena pracy doktorskiej obejmowała część merytoryczną i metodologiczną pracy oraz podsumowanie i wnioski końcowe. Rozprawa doktorska Pana lek. med. Mikołaja Radziszewskiego została skonstruowana na podstawie klasycznej dysertacji. Przedstawiona do recenzji praca jest obszerna i obejmuje 150 stron z tradycyjnym podziałem na wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję oraz wnioski, a także streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo oraz wykaz skrótów, spis tabel (w liczbie 14), rycin i wykresów (w liczbie 38). Do pracy dołączona jest także zgoda Komisji Bioetycznej.

Tytuł rozprawy jest sformułowany poprawie i obejmuje część naukową pracy doktorskiej. We Wstępie Autor szczegółowo przedstawił rys podstawy wiedzy na temat choroby Gravesa i Basedowa (GD - ang. Graves' disease), epidemiologię, etiologię i patogenezę choroby, objawy, rozpoznanie oraz metody leczenia i monitorowania pacjentów z GD. We wstępie Autor opisuje także fascynujący mechanizm wpływu na ekspresję genów poprzez mechanizmy epigenetyczne tłumacząc definicję epigenetyki, najczęstszy mechanizm epigenetyczny jakim jest metylacja DNA, rolę epigenetyki w patogenezie oraz przebiegu choroby Gravesa i Basedowa, opisywany w literaturze związek działania glikokortykosteroidów i zmian metylacji DNA oraz inne zaburzenia epigenetyczne w chorobie Gravesa i Basedowa, jak działanie na ekspresję mikroRNA. Zgodnie z tematyką pracy doktorskiej Doktorant opisuje szczegółowo procesy epigenetycznej w GD. Autor kończy wstęp sformułowaniem potwierdzającym słuszność podjętego tematu pracy doktorskiej. Wstęp jest szczególnie wartościowym tekstem pod względem edukacyjnym i według mojej oceny kwalifikuje się na dobrą publikację. Ponadto nie ukrywam, że min z tego powodu dysertacja ta znajdzie miejsce w mojej podręcznej bibliotece.

Nie mam uwag merytorycznych w tej części poza jedną: brakiem praktycznych uwag co do użyteczności diagnostyczno-prognostycznej dostępnych metod genetycznych w chorobie Gravesa-Basedowa (a wiemy, że pomimo tej wiedzy, jaką opisał doktorant, jest ona ograniczona). Wstęp stanowi prawidłowe omówienie poruszanych zagadnień, w oparciu o aktualną literaturę i pozwala czytelnikowi na zapoznanie się z problemami, na których Doktorant skupia się w swojej pracy badawczej. Przedstawiona analiza aktualnej literatury nie pozostawia wątpliwości, że decyzja Doktoranta o kierunku prowadzonych badań jest w pełni uzasadniona zakresem obecnej wiedzy, zarówno z naukowego, jak i klinicznego punktu widzenia.

Założenia i cel rozprawy doktorskiej Pana Mikołaja Radziszewskiego zostały sformułowane logicznie, spójnie i konkretnie, co potwierdza dojrzałość naukową Doktoranta. Założeniem pracy doktorskiej było stwierdzenie, że GD jest heterogenną chorobą autoimmunizacyjną, a rozwój choroby, jej przebieg oraz odpowiedź na leczenie pozostają bardzo trudne do przewidzenia oraz że patogenezą GD obejmuje złożone interakcje między wieloma czynnikami genetycznymi, środowiskowymi i endogennymi. Głównym celem pracy projektu badawczego Doktoranta była ocena całogenomowej metylacji DNA komórek krwi obwodowej u pacjentów z aktywną orbitopatią tarczycową w trakcie leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami (projekt określany jako 1) oraz ocena dorosłych i dzieci ze świeżym rozpoznaniem choroby Gravesa i Basedowa (projekt określany jako 2). Ponadto Doktorant sformułował szczegółowe cele badawcze, co stanowi o ambicji projektu.

Badaniami zostało objętych 58 osób z GD, w tym w projekcie 1 – 26 osób z orbitopatią w przebiegu GD oraz w projekcie 2 – 12 dorosłych i 6 dzieci z GD. Liczba pacjentów włączonych do badania mogłaby się wydawać niewielką (również z uwagi na heterogenność metylacji w tkankach, która zależy też od wielu innych nieuwzględnionych w pracy czynników), jednak jest statystycznie adekwatna. Natomiast z uwagi na wysokie koszty oceny całogenomowej metylacji DNA z pewnością przekraczałyby to możliwości grantowe Doktoranta. Zresztą w poszczególnych publikacjach liczba badanych pacjentów jest porównywalna do liczby pacjentów włączonych do projektów tworzących pracę doktorską. Pacjenci byli rekrutowani w Klinice Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz w Klinice Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii z Pododdziałem Kardiologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Grupę kontrolną stanowiło 14 dorosłych i 5 dzieci bez GD. W części Materiał i Metody opisane są kryteria włączenia i wyłączenia do badania. Pacjenci z orbitopatią w GD otrzymali standardowe warianty leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami wg rekomendacji EUGOGO. Między innymi to przekonuje recenzenta o podstawach EBM w pracy doktorskiej. W tej części bardzo szczegółowo opisano metody laboratoryjne zastosowane w projekcie min metody sekwencjonowania nowej generacji, zredukowanego reprezentacyjnego sekwencjonowania bisulfitowego (ang. reduced representation bisulfite sequencing, RRBS). Badanie całogenomowej

metylacji wykonano w Zakładzie Genetyki Medycznej WUM, który znany jest jako ośrodek ekspercki dla badań genomowych. Wykonano szereg analiz statystycznych metylacji DNA: analizę opisową wzorców metylacyjnych dla pojedynczych CpG oraz dla konkretnych regionów odniesienia, jak regiony promotorowe genów, regiony samych genów i wysp CpG, a także analizowano całogenomowe różnice w metylacji DNA na poziomie chromosomów autosomalnych i znamienych regionów przedstawionych w literaturze. W obu projektach wykonano ogrom pracy. Nie przedstawiono jednak źródła finansowania projektów.

Podsumowując tę część doktoratu, metodyka badań i dobór metod statystycznych są właściwe. Rozdział Materiał i Metody został przedstawiony bardzo szczegółowo. Projekt badania uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej WUM (uchwała nr KB-151/2019).

Wyniki badań Autor szczegółowo przedstawił obszernie na 44 stronach, a dyskusję na 21 stronach. Jednak ten krótszy rozdział Dyskusja, według mojej oceny jest napisany rzetelnie i na podstawie porównywania wyników badań własnych z danymi literaturowymi. W rozdziale Dyskusja Autor przedstawia opis korelacji całogenomowej hipometylacji DNA z orbitopatią i GD, zarówno na poziomie całogenomowym jak i szczegółowym, a także znaczenie funkcjonalne (wzbogacenie szlaków metabolicznych) zaburzeń metylacji DNA. W Dyskusji Autor podkreśla, że wytypowano sygnatury metylacyjne w postaci CpG mapowanych na wiele genów związanych m.in. z układem odpornościowym i metabolizmem komórkowym, potwierdzając przy tym doniesienia literaturowe i podkreślając przy tym również rolę nikotynizmu w obrazie zaburzeń metylacji DNA oraz prawdopodobnej patogenezie GD. Autor podaje, że po raz pierwszy wykazano również różnice w stopniu metylacji DNA u dzieci z GD, w skali całogenomowej i szczegółowej, a także przedstawiono różnice wzorców metylacji DNA w GD w zależności od wieku. W rozdziale Dyskusja podany jest ogrom genów z odmienną metylacją w chorobie GD i grupie kontrolnej, wskazuje to na bardzo skomplikowany wielogenowy, czy nawet wieloczynnikowy mechanizm choroby.

W rozdziale Dyskusja cenna jest część przedstawiająca ograniczenia projektu (min heterogenność badanych grup, zastosowanie do analizy zaburzeń metylacji DNA populacji wszystkich leukocytów krwi obwodowej oraz różna interpretacja uzyskiwanych wyników w literaturze w zależności od rodzaju analizy metylacji DNA), a także kierunki dalszych badań uzasadnionych brakiem wiedzy dotyczącej patomechanizmów choroby. Rozdział Dyskusja jest kwintesencją naukowej analizy w odniesieniu do praktycznych korzyści dla medycyny.

W odpowiedzi na postawione cele, Autor sformułował dziewięć właściwych i logicznych wniosków. Autor podkreśla, że po raz pierwszy wykazano wpływ dożylnych glikokortykosteroidów na obraz całogenomowej metylacji DNA w orbitopatii związanej z chorobą Gravesa-Basedowa, a także po raz pierwszy scharakteryzowano szczegółowe i całogenomowe zaburzenia metylacji DNA w grupie dzieci z GD oraz wśród palących, dorosłych pacjentów z GD. Interesująca jest obserwacja autora, że całogenomowe wzorce metylacji DNA różnicują osoby zdrowe z

chorymi z GD oraz z chorymi z orbitopatią (pacjenci z GD prezentują całogenomową hipometylację DNA względem osób zdrowych) oraz że całogenomowe wzorce metylacji DNA ulegają zmianie po terapii dożylnymi glikokortykosteroidami chorych z aktywną orbitopatią.

Dzieci z GD wykazują pojedyncze, odmienne wzorce metylacji DNA względem dzieci zdrowych, natomiast dorośli i dzieci z GD nie różnią się profilem całogenomowej metylacji DNA, a dyskryminującym czynnikiem dla wzorców metylacji DNA obu grup jest nikotynizm, związany z hipermetylacją u osób palących. Szczegółowe różnice w stopniu metylacji DNA między osobami dorosłymi i dziećmi z GD są związane z pojedynczymi genami *FANK1*, *GRM2* oraz *CDK2AP2P2*, natomiast analiza szczegółowa u dzieci również ujawniła związek GD z zaburzeniami metylacji pojedynczych genów jak: *TAGLN*, *ONECUT1*, *OSM*, *NKX6-3*, *CALML5*.

Ważnym wnioskiem jest również obserwacja, że różnice metylacji DNA u chorych i zdrowych skupiają się na genach szlaków metabolicznych jak geny uczestniczące we wrodzonej odporności, geny cytokin prozapalnych, czynników wzrostu i rozwoju narządu wzroku.

Według mojej oceny przedstawione w dysertacji wnioski są bardzo praktyczne. Całościowo jestem pod wrażeniem przedstawionej pracy doktorskiej, jej celów i wyników.

Doktorant zacytował olbrzymią liczbę pozycji literaturowych (232), właściwie dobranych i aktualnych, dotyczących sedna poruszanych zagadnień. Wszystkie cytowane publikacje dowodzą znajomości przez Doktoranta literatury przedmiotu oraz umiejętności korzystania z licznych i różnorodnych źródeł wiedzy.

Podsumowanie:

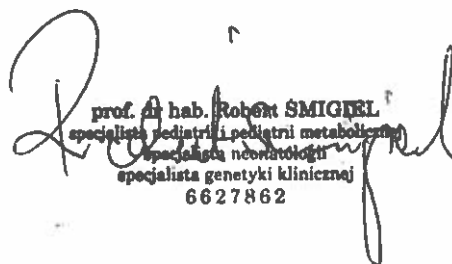
W podsumowaniu podkreślę, że uzyskane rezultaty mają znaczenie dla nauki i praktyki klinicznej, Doktorant poprawnie formułuje problemy i założenia badawcze, wykazuje trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania. Dysertacja Doktoranta cechuje się prawidłowym układem pracy i struktury podziału treści, poprawnością formalno-językową. Zidentyfikowałem zbyt wiele błędów interpunkcyjnych czy ogólnie redakcyjnych (podaję tylko dwa przykłady błędów: „co raz lepiej” (str 40), „sekwencjonowania nowej geenracji” (str 55)), co oczywiście zupełnie nie umniejsza wartości naukowej tej pracy.

W mojej ocenie rozprawa doktorska Pana lek. med. Mikołaja Radziszewskiego spełnia wymogi i warunki stawiane tego typu rozprawom określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r., poz. 1571 ze zm.). Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana Mikołaja Radziszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie nagrodą dysertacji doktorskiej Pana lek. med. Mikołaja Radziszewskiego z uwagi na jej naukową i kliniczną wartość oraz z uwagi na

ogrom pracy włożonej w dysertację. Wiosek o wyróżnienie podkreśla również znaczenie ośrodków klinicznych, w których prowadzone były badania Doktoranta.

Prof. dr hab. Robert Śmigiel



prof. dr hab. Robert ŚMIGIEL
specjalista pediatrii i pediatrii metabolicznej
specjalista neonatologii
specjalista genetyki klinicznej
6627862

