



Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej
Zakład Biochemii Kwasów Nukleinowych

Pomorska 251, 92-213 Łódź; piętro IX, pok. 126
tel. (42) 2725354; e-mail agnieszka.sliwinska@umed.lodz.pl



Łódź, 9 marca 2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **lek. Aleksandry Kucharskiej-Lusina** pt.

„Profilowanie molekularnych markerów ryzyka rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów”

Promotor: prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek,

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska to cykl trzech publikacji tematycznych, dwie prace oryginalne oraz jedna praca pogładowa. Prace oryginalne zostały opublikowane w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, praca pogładowa została opublikowana w czasopiśmie *Wiadomości Lekarskie*. Doktorantka jest pierwszym autorem prac oryginalnych i jedynym autorem pracy pogładowej, zatem jej wkład w powstanie każdej z nich jest znaczący. Sumaryczny IF artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej to $IF=9,8$ i 300 punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Prace eksperymentalne prowadzono w dwóch ośrodkach: Centrum Medyczne Vadimed w Krakowie, gdzie rekrutowano uczestników do badania oraz w MOLEcoLAB Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, gdzie wykonano badania molekularne.

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą, autoimmunologiczną chorobą tkanki łącznej, objawiającą się procesem zapalnym, głównie w obrębie drobnych stawów rąk i stóp, prowadzącą do deformacji i trwałych uszkodzeń stawów. Charakterystycznym objawem RZS zgłaszanym przez pacjentów jest ból, sztywność oraz obrzęk stawów rąk i stóp. Zapalenie może rozwinąć się również w innych stawach. W przebiegu RZS dochodzi do zapalenia błony maziowej stawów, tworzenia się łuszczyki i nadżerek kości, które często prowadzi do niepełnosprawności. Dlatego ważna jest diagnoza RZS na wczesnym etapie jej rozwoju oraz wdrożenie odpowiedniego leczenia, aby zapobiec zniszczeniu stawów i wystąpieniu niepełnosprawności. Nielezione RZS prowadzi także do uszkodzenia wielu narządów i przedwczesnego zgonu. Częstość występowania RZS wśród osób dorosłych wynosi 0,1 do 0,5 %, a najwięcej zachorowań występuje między 3. a 5. dekadą życia. Kobiety chorują trzy razy częściej niż mężczyźni.

Patogeneza RZS nie jest do końca poznana, wiadomo, że jej rozwój związany jest z

czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, które inicjują proces zapalny wewnątrz stawu. Dotychczas nie zidentyfikowano czynnika(ów), który(e) stymuluje błonę maziową wyścielającą staw do odpowiedzi zapalnej. Najnowsze badania mają na celu wyjaśnienie w jaki sposób dysfunkcja komórek układu odpornościowego przyczynia się do uszkodzenia stawu. Sugeruje się, że akumulacja błędnie sfałdowanych białek w siateczce śródplazmatycznej (ER) wywołująca tzw. stres siateczki śródplazmatycznej, i inicjująca szlak odpowiedzi na niesfałdowane białka (ang. *Unfolded Protein Response*, UPR) może odgrywać istotną rolę w rozwoju RZS. Odpowiedź na niesfałdowane białka (UPR) związana jest między innymi z aktywacją szlaku PERK/eIF2 α , który dalej pobudza szlak NF- κ B inicjujący odpowiedź zapalną komórki. Jeśli ilość nieprawidłowo sfałdowanych białek w komórce jest zbyt duża, odpowiedź UPR inicjuje apoptozę komórki. Najnowsze badania wykazały, że w makrofagach i tkankach maziowych pacjentów z rozpoznaniem RZS, poziom ekspresji genu *EIF2AK3* kodującego kinazę PERK, odpowiedzialną za fosforylację czynnika transkrypcyjnego eIF2 α , jest istotnie podwyższona. Dlatego praca doktorska miała na celu ocenę ekspresji genów związanych z odpowiedzią UPR i apoptozą: *PERK*, *eIF2 α* , *ATF4*, *BAX*, *BCL-2*, *BBC3 (PUMA)* i *TP53*. Dodatkowo, oceniono również podatność na apoptozę jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs,) w oparciu o analizę markerów apoptozy, tj.: aktywność kaspazy 3, analizę odsetka komórek we wczesnej apoptozie i uszkodzenia DNA. Materiał do badań stanowiła krew obwodowa, która została pobrana od osób ze świeżo rozpoznaniem RZS (grupa badana) i od osób zdrowych dopasowanych pod względem wieku i płci (grupa kontrolna). Rozpoznanie RZS oparte było o aktualne kryteria ACR/EULAR. Kryteria włączenia i wykluczenia z badania dla grupy badanej i kontrolnej zostały jasno wskazane. Badanie przeprowadzono w oparciu o zgodę Komisji Bioetycznej nr 7/KBL/OIL/2022 oraz nr 2/KBL/IL/2024.

W pierwszym badaniu analizowano ekspresję genów będących składowymi szlaku UPR zależnego od PERK: *PERK*, *eIF2*, *ATF4*, oraz związanych z apoptozą *BAX* i *BCL-2* w krwi pobranej od 56 pacjentów chorych na RZS i od 30 osób z grupy kontrolnej. W grupie badanej zmierzono również poziom OB i CRP oraz wskaźnik DAS-28 w momencie rozpoznania RZS oraz po 3 miesiącach leczenia. Wdrożone leczenie istotnie obniżyło OB, CRP i wskaźnik DAS-28. Poziom ekspresji wszystkich badanych genów był istotnie statystycznie podwyższony u chorych na RZS, niezależnie od tego czy analizowano całą grupę czy z podziałem na płeć. Zatem, uzyskane wyniki wspierają sugestie, że odpowiedź na niesfałdowane białka (UPR) zależna od PERK, może być związana z patogenezą RZS. W kontekście uzyskanych wyników bardzo ciekawym badaniem byłaby analiza poziomu ekspresji ww. genów po wdrożeniu leczenia, jak w przypadku OB i CRP oraz CAS-28, takie dane pozwoliłyby bardziej precyzyjnie odnieść się do konkluzji sugerującej, że celowanie w komponenty szlaku UPR może przyczynić się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych RZS.

Druga praca włączona do cyklu, to przegląd aktualnej wiedzy dotyczącej osobniczych i molekularnych czynników ryzyka RZS. Na uwagę zasługuje część pracy poświęcona najnowszym odkryciom z badań *in vitro*, na modelu zwierzęcym RZS oraz przeprowadzonych z udziałem chorych

na RZS. W badaniach na modelu zwierzęcym, w których stosowano inhibitory PERK odnotowano zmniejszenie produkcji cytokin prozapalnych i stanu zapalnego w stawach. Natomiast, badania przeprowadzone z udziałem chorych na RZS wskazują na istotną rolę szlaku UPR zależnego od PERK w patogenezie RZS.

W drugim badaniu analizowano ekspresję genów związanych z apoptozą indukowaną poprzez szlak UPR: *eIF2α*, *BBC3* i *TP53* w krwi pobranej od 31 pacjentów chorych na RZS i od 30 osób z grupy kontrolnej. W metodologii nie podano nr katalogowego sond dla *eIF2α* i/lub *eIF2*. Jest to istotne, ponieważ *eIF2* jest heterotrimerem zbudowanym z trzech podjednostek $\alpha\beta\gamma$. W grupie badanej zmierzono także poziom OB i CRP oraz wskaźnik DAS-28 w momencie rozpoznania RZS oraz po 3 miesiącach leczenia. Wdrożone leczenie istotnie obniżyło OB, CRP i wskaźnik DAS-28. Poziom ekspresji *eIF2α*, *BBC3* i *TP53* był istotnie statystycznie podwyższony u chorych na RZS. Następnie, z krwi obwodowej wyizolowano leukocyty jednojądrzaste (PBMC), które poddano działaniu nadtlenu wodoru w celu indukcji uszkodzeń DNA i apoptozy. Zaobserwowano, że PBMC izolowane od chorych na RZS były bardziej wrażliwe na działanie nadtlenu wodoru niż od osób z grupy kontrolnej, tj. prezentowały wyższy poziom uszkodzeń DNA w ogonie komety oraz wyższą aktywność kaspazy 3. Co więcej, inkubacja PBMC izolowanych od chorych na RZS z nadtlenkiem wodoru w większym stopniu indukowała śmierć tych komórek na drodze apoptozy niż u osób z grupy kontrolnej. Jednocześnie, poziom uszkodzeń DNA i aktywność kaspazy 3 nie różniły się istotnie w PBMC nietraktowanych nadtlenkiem wodoru pomiędzy grupą badaną a kontrolną.

Po zapoznaniu się z dysertacją proszę, aby Doktorantka odniosła się do sugestii, które pojawiły się w części opisowej recenzji, dotyczących doprecyzowania sond zastosowanych do analizy poziomu *eIF2α* oraz *eIF2* w badaniu pierwszym oraz drugim badaniu dotyczącym analizy ekspresji genów.

Proszę również o komentarz czy wg Doktorantki badane markery apoptozy nadają się do wykrywania RZS, skoro poziom uszkodzeń DNA i aktywność kaspazy 3 nie różniły się istotnie w PBMC nietraktowanych nadtlenkiem wodoru pomiędzy grupą badaną a kontrolną?

W pracy pojawiły się drobne błędy edytorskie. W opisie metody izolacji PBMC zarówno w publikacjach, jak i w dysertacji, Doktorantka używa określenia „stężenie komórek”, „zawiesina” w odniesieniu do stężenia molowego nadtlenu wodoru, nie jest to poprawna forma. Dodatkowo, załączone ryciny nie mają pełnej legendy, stąd łatwiej posługiwać się dołączonymi oryginalnymi publikacjami. Jednocześnie warto zauważyć, że rozdział dysertacji w języku polskim dotyczący RZS, został przygotowany bardzo dobrze i prezentuje doskonałą wiedzę kliniczną Doktorantki.

W podsumowaniu chciałabym zapytać Doktorantkę, jak w kontekście uzyskanych wyników rysuje się przyszłość zastosowania inhibitorów PERK w leczeniu RZS?

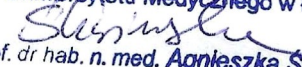
Powyższe uwagi i sugestie nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej Pani Aleksandry Kucharskiej-Lusina i mojej pozytywnej opinii. Rozprawa doktorska przedstawia wysoką wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Recenzowana rozprawa doktorska zawiera elementy nowości naukowej osiągniętej

dzięki zastosowaniu odpowiednich metod badawczych z wykorzystaniem biologii molekularnej.

Cele pracy zostały osiągnięte, a wyniki opublikowano w czasopismach z listy JCR o wysokim IF. Tym samym rozprawa doktorska Pani Aleksandry Kucharskiej-Lusina spełnia wszystkie wymogi o uzyskanie stopnia doktora zawarte w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.).

Pragnę podkreślić, że Doktorantka oprócz prac związanych z rozprawą doktorską jest współautorem 19 innych publikacji o łącznej IF 29,6 i 910 pkt Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Mając na uwadze koncepcję badawczą oraz wartość poznawczą jaką wnoszą wyniki, składam do Rady Naukowej Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki” wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. Aleksandry Kucharskiej-Lusina.

KIEROWNIK
Zakładu Biochemii Kwasów Nukleinowych
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Agnieszka Śliwińska

prof dr hab. n. med. Agnieszka Śliwińska