



UNIwersytet
MEDYCZNY
W ŁODZI



Łódź, 27.02.2020

Prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek
Kierownik Zakładu i Katedry
Zakład Chemii i Biochemii Klinicznej
Katedra Chemii i Biochemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Recenzja pracy doktorskiej

mgr inż. Joanna Świerkowska

Charakterystyka wybranych aspektów (epi)-genetycznych w wysokiej krótkowzroczności
u polskich pacjentów

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Marzena Gajęcka
Promotor pomocniczy: Dr inż. n. farm. Justyna A. Karolak



Wysoka krótkowzroczność (ang. high myopia, HM) to niezdolność oka do tworzenia prawidłowo zogniskowanego obrazu na siatkówce, charakteryzująca się wielkością wady przekraczającą -6,0 dioptrii oraz wydłużeniem gałki ocznej powyżej 26 mm. Wysoka krótkowzroczność ma wieloczynnikową etiologię, warunkowaną przez czynniki środowiskowe oraz genetyczne. Dotychczas zidentyfikowano liczne *loci*, geny i warianty sekwencji powiązane z HM w poszczególnych populacjach lub rodzinach, jednakże niewiele wiadomo na temat (epi)-genetycznych przyczyn powstawania HM w populacji polskiej.

Dane epidemiologiczne na temat krótkowzroczności i HM są zróżnicowane i zależą w dużym stopniu od pochodzenia etnicznego pacjentów. Na podstawie badań epidemiologicznych oszacowano, że 22,9% (~ 1,4 mld) populacji ludzkiej jest obarczona krótkowzrocznością, a u ok. 2,7% (163 mln) ludzi stwierdzono wysoką krótkowzroczność.

Do czynników środowiskowych zwiększających ryzyko powstawania wysokiej krótkowzroczności zaliczane są czynności wymagające długotrwałej akomodacji oka, takie jak praca z bliska, czytanie, pisanie czy praca przy komputerze. wraz ze wzrostem ilości czasu poświęconego na wyżej wymienione czynności wzrasta wielkość krótkowzrocznej wady refrakcji u dzieci w wieku szkolnym. Ryzyko wystąpienia krótkowzroczności podwyższają także wyższy poziom wykształcenia związany z ilością czasu poświęconego na naukę z książek, praca przy komputerze czy zwiększony stopień urbanizacji. Kolejnym czynnikiem podwyższającym ryzyko wystąpienia wysokiej krótkowzroczności jest zwiększona ekspozycja na sztuczne oświetlenie oraz dieta z nadmiernym spożyciem węglowodanów. Wyniki badań naukowych potwierdzają udział również czynników genetycznych w warunkowaniu krótkowzroczności oraz HM.

Zidentyfikowano wiele *loci* powiązanych z HM w pojedynczych rodzinach i/lub populacjach. Rozpoznano liczne *loci*, geny i warianty sekwencji powiązane z HM, jednak były one charakterystyczne tylko dla badanych populacji, a nawet opisane jako warunkujące lub możliwie warunkujące HM w poszczególnych rodzinach, jednakże zależności te nie zostały potwierdzone w innych badaniach prowadzonych w różnych populacjach. Z powodu braku jednoznacznych dowodów nie można uznać tych genów kandydatów za warunkujące krótkowzroczność lub HM w populacji ogólnej.

W odniesieniu do dostępnych danych głównym celem niniejszej pracy stała się identyfikacja nowych czynników (epi)-genetycznych w etiologii HM u polskich pacjentów. Ponadto, wśród celów szczegółowych mgr inż. Joanna Świerkowska wyróżniła opracowanie danych klinicznych



pozyskanych od członków polskich rodzin z dziedziczną HM, z uwzględnieniem statystyki opisowej, testowej i analizy korelacji parametrów okulistycznych, weryfikację wyników sekwencjonowania eksomowego, przeprowadzonego na DNA wybranych członków rodzin z HM, poprzez sekwencjonowanie metodą Sangera oraz analizę segregacji u pozostałych członków rodzin, analizę wpływu wybranych wariantów sekwencji na długość osiową gałki ocznej, ciśnienie wewnątrzgałkowe oraz krzywiznę rogówki w HM, analizę wyników całogenomowej metylacji DNA u polskich dzieci z HM w celu identyfikacji genów i ścieżek sygnałowych mających znaczenie w etiologii HM. Materiałem do badań z wykorzystaniem technik biologii molekularnej było DNA z krwi obwodowej członków polskich rodzin z HM oraz grupy polskich dzieci.

W badaniach wzięły udział rodziny polskie, w których u przynajmniej dwóch osób zdiagnozowano wysoką krótkowzroczność. Pacjentów rekrutowano do badań w trzech polskich instytucjach: Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku oraz w Wojewódzkim Szpitalu w Lesznie. Rodziny polskie zostały poddane badaniom podmiotowym obejmującym wiek rozpoznania wady, stosowaną korekcję wzroku, współistniejące i przebyte choroby narządu wzroku i choroby ogólne.

Otrzymane przez Doktorantkę wyniki potwierdzają, że rodzinie występująca wysoka krótkowzroczność może mieć zróżnicowane podłoże genetyczne w poszczególnych rodzinach. Brak segregacji analizowanych wariantów sekwencji z fenotypem HM oraz długością gałek ocznych, wysokim ciśnieniem wewnątrzgałkowym lub dużym promieniem krzywizny rogówki może wskazywać na powiązanie innych wariantów niż te zbadane z danymi parametrami okulistycznymi u pacjentów z wysoką krótkowzrocznością. Jednocześnie otrzymane wyniki wskazują, iż hipermetylowane lub hipometylowane dinukleotydy CpG, zlokalizowane w regionach okołopromotorowych genów *GSTM1*, *LCE3C*, *FARP2* oraz odpowiednio *SORBS2*, *TANC1*, *ATXN1* i *ADAM20* mogą mieć wpływ na wyciszenie/nadekspresję tych genów i brać udział w patogenezie wysokiej krótkowzroczności u polskich dzieci.

W ocenie merytorycznej realizacji zamierzonych celów pracy należy podkreślić wysmienicie zaplanowany oraz przemyślany proces badawczy, który pozwolił na kompleksowe badanie zależności występowania HM od czynników genetycznych. Przeprowadzone badania potwierdziły, co najbardziej istotne złożoność podłoża genetycznego wysokiej krótkowzroczności. W ramach realizacji celów szczegółowych zidentyfikowano nowe czynniki genetyczne i epigenetyczne potencjalnie zaangażowane w etiologię wysokiej krótkowzroczności u polskich pacjentów i tym samym zrealizowano założenia celu głównego pracy doktorskiej.



W pracy jednoznacznie zidentyfikowano nowe czynniki (epi)-genetyczne zaangażowane w etiopatologię HM u polskich pacjentów. Realizacja pracy doprowadziła do kluczowych wniosków: 1) Warianty sekwencji: c.3704G>A w ABCC6, 1642G>C w FLRT3 i c.938C>T w SLC35E2B mogą warunkować fenotyp wysokiej krótkowzroczności w rodzinach, w których zostały zidentyfikowane; 2) Brak segregacji analizowanych wariantów sekwencji z fenotypem HM oraz długością gałek ocznych, wysokim ciśnieniem wewnątrzgałkowym lub dużym promieniem krzywizny rogówki; 3) Hipermetylowane lub hipometylowane dinukleotydy CpG, zlokalizowane w regionach okołopromotorowych genów GSTM1, LCE3C, FARP2 oraz odpowiednio SORBS2, TANC1, ATXN1 i ADAM20 mogą mieć wpływ na wyciszenie/nadekspresję tych genów i brać udział w patogenezie wysokiej krótkowzroczności u polskich dzieci. W podsumowaniu, otrzymane wyniki potwierdzają, że rodzinie występująca wysoka krótkowzroczność może mieć zróżnicowane podłoże genetyczne w poszczególnych rodzinach. Jednocześnie, można wskazywać na powiązanie innych wariantów niż te zbadane z parametrami okulistycznymi u pacjentów, co umożliwia identyfikację nowych ścieżek sygnałowych które mogą również odgrywać istotną rolę w etiologii wysokiej krótkowzroczności.

Jednym z istotnych aspektów pracy, które doprowadziły do kluczowych wniosków końcowych jest mechanizm epigenetycznej metylacji DNA. Epigenetyka jest często pomijana we wnioskowaniu etiopatologicznym, ponieważ zajmuje się analizą dziedzicznych zmian w ekspresji genów, które nie pozostają w bezpośredniej korelacji ze zmianami w samej sekwencji DNA. Jednakże regulacja epigenetyczna, co wykazała Doktorantka przebiega wielostopniowo i może być modulowana na każdym z etapów, pozostaje również pod silnym wpływem czynników środowiskowych. Ponieważ, modulacja epigenetyczna stanowi jeden z elementarnych szlaków regulacji ekspresji genów, proszę Doktorantkę o omówienie epigenetycznych mechanizmów regulacji ekspresji genów w aspekcie wyników sekwencjonowania eksomowego przeprowadzonego w pracy.

Czynniki środowiskowe oraz prawidłowa suplementacja diety, w tym podaż folianów mają istotne znaczenie dla zdrowia i rozwoju człowieka. Metabolizm kwasu foliowego jest głównym procesem dostarczającym i regulującym podaż grup metylowych, stąd zaburzenia odżywiania wpływają na dysregulację mechanizmów epigenetycznych i epigenomicznych. W tym kontekście metabolizm folianów odgrywa kluczową rolę w regulacji epigenetycznej natomiast, nieprawidłowa podaż kwasu foliowego pozostaje w korelacji ze zwiększoną skłonnością do powikłań jak i chorób przewlekłych w życiu człowieka. Proszę Doktorantkę o omówienie mechanizmu prewencyjnego



działania kwasu foliowego, który polega na obniżaniu poziomu homocysteiny oraz na poprawie funkcjonowania naczyń krwionośnych w oku, dzięki właściwościom antyoksydacyjnym.

Poddając ocenie rozprawę doktorską mgr inż. Joanny Świerkowskiej, należy ze szczególnym uwzględnieniem podkreślić wartościowy pod względem badań podstawowych, ale przede wszystkim możliwości wykorzystania wyników w praktyce klinicznej temat pracy, który odzwierciedla bardzo wysoką aktywność oraz dojrzałość zawodową Doktorantki. Potwierdzeniem tego sukcesu są oryginalne wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej, które wyznaczają pionierskie kierunki badań związane z (epi)-genetycznymi aspektami w wysokiej krótkowzroczności u polskich pacjentów. Dlatego, chciałbym podkreślić, że dysertacja mgr inż. Joanny Świerkowskiej stanowi przykład doskonałego modelu współpracy Pani Prof. dr hab. n. med. Marzeny Gajęckiej oraz Doktorantki, która korzystając z wieloletniego doświadczenia oraz bogatego warsztatu naukowego swojego Promotora osiągnęła wymierne efekty, które z całą pewnością określić można miarą sukcesu.

Dodatkowo należy mocno podkreślić, iż badania w ramach dysertacji zostały przeprowadzone w ramach realizacji grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na finansowanie prac badawczych lub rozwojowych, mających na celu rozwój młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN. Tytuł projektu: „Weryfikacja wyników sekwencjonowania całego egzomu oraz analiza segregacji wybranych wariantów sekwencji w wysokiej krótkowzroczności w rodzinach polskich”, kierownik projektu: mgr inż. Joanna Świerkowska, nr projektu: 27/GM/2017. Ponadto Doktorantka otrzymała stypendium doktoranckie Środowiskowego Studium Doktoranckiego Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w latach 2014 – 2019 oraz stypendium dla najlepszych doktorantów Instytutu Genetyki Człowieka PAN w latach 2015, 2016 i 2019. Pani mgr inż. Joanna Świerkowska jest autorką komunikatów międzynarodowych konferencyjnych oraz recenzowanych publikacji naukowych w renomowanych czasopismach naukowych z Listy Filadelfijskiej, m.in.: *Ophthalmic Genetics* oraz *Scientific Reports*, IF powyżej 4, co podkreśla wysoki poziom innowacyjności prowadzonych badań naukowych całego zespołu Pani prof. Marzeny Gajęckiej.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Z przyjemnością przedkładam do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Świerkowskiej do dalszych etapów



UNIwersYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI



przewodu doktorskiego oraz ze względu na wysoki poziom naukowy tej dysertacji, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

Z poważaniem,

KIEROWNIK

Katedry Chemii i Biochemii Medycznej
Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Ireneusz Majsterek