

dr hab. med. Agnieszka Osmola-Mańkowska

ul. Cisowa 14/1

62-070 Dąbrówka

### **Recenzja rozprawy doktorskiej Pana magistra Michała Walczaka**

**pt. „Badania farmakogenetyczne u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna poddanych terapii anty-TNF”, wykonanej w Zakładzie Funkcji Kwasów Nukleinowych Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, pod kierunkiem dr hab. n. med. Marzeny Skrzypczak-Zielińskiej.**

### **Materiał źródłowy**

Materiał źródłowy do opracowania niniejszej recenzji stanowił opracowany maszynopis dysertacji doktorskiej pt. **„Badania farmakogenetyczne u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna poddanych terapii anty-TNF”**, obejmujący 111 stron, w tym 14 rycin, 17 tabel oraz 165 pozycji piśmiennictwa.

Praca została napisana w strukturze numerowanych rozdziałów, typowej dla rozpraw doktorskich. Zawiera następujące części: wstęp, hipoteza badawcza, materiały i metody, wyniki, dyskusję i podsumowanie oraz streszczenia w języku polskim i angielskim a także wykaz stosowanych skrótów, spis rycin i tabel.

Dodatkowo zawarto również spis prac opublikowanych podczas przygotowywania doktoratu, dokumentację udziału w projektach i stażach naukowych.

### **Ocena merytoryczna**

Doktorant podjął temat ciekawy i ambitny a jednocześnie mogący w przyszłości dostarczyć niezwykle praktycznych informacji dla klinicystów. Opracowanie w przyszłości predykcyjnych testów odpowiedzi na leczenie daną terapią biologiczną jest wysoce oczekiwane i przyczyni się do rozwoju coraz bardziej pożądanego personalizacji leczenia.

## I. Wstęp.

Wstęp rozprawy składający się z kilku podrozdziałów, stopniowo wprowadza czytelnika w tematykę omawianego zagadnienia. Doktorant wyczerpująco przedstawia definicję i etiologię nieswoistych chorób zapalnych jelit w tym choroby Leśniowskiego-Crohna z naciskiem na podłoże genetyczne i epigenetyczne. Szczególnie ważny w kontekście planowanych badań jest podrozdział dotyczący aktualnych metod leczenia z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych i białek fuzyjnych, zagadnienia farmakogenetyki i medycyny personalizowanej. Część ta konsekwentnie prowadzi do sformułowania założeń i celów pracy.

## II. Hipoteza badawcza i cel pracy

Hipoteza zakłada, że pierwotny brak odpowiedzi na leczenie anti-TNF u pacjentów z ChL-C wynika z wariantów sekwencji 23 genów wybranych do badań farmakogenetycznych uczestniczących w działaniu TNF (czynniki zaliczane do nadrodziny TNF, czynniki prozapalne potencjalne mediatory braku odpowiedzi na przeciwciała anti-TNF, receptory i białka powiązane z apoptozą oraz receptory istotne dla mechanizmów odpowiedzi wrodzonej).

Wyznaczono następujące cele pracy:

- zaprojektowanie i optymalizacja metodyki przygotowania bibliotek amplikonowych do sekwencjonowania następnej generacji NGS wybranych genów związanych z działaniem TNF i przeprowadzenie analizy genetycznej na grupie 107 polskich pacjentów z ChL-C leczonych przeciwciałami anti-TNF.
- określenie profilu ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA w bioptatach jelita pobranych od pacjentów nieodpowiadających na leczenie anti-TNF i porównanie z profilem ekspresji pacjentów odpowiadających na tę terapię oraz profilem ekspresji osób zdrowych.
- zbadanie wpływu przeciwciał anti-TNF na apoptozę limfocytów T w badanej grupie pacjentów i osób zdrowych.
- określenie wpływu przeciwciał anti-TNF na profil ekspresji wytypowanych genów w modelu opartym o hodowle in vitro limfocytów T z krwi pacjentów z ChL-C.

Koncepcja pracy jest właściwa a cele czytelnie wskazują kierunki planowanych badań.

## III. Materiały i metody

Materiał biologiczny pochodził od pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna będących pod opieką Katedry i Kliniki Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu



Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Pacjenci w liczbie 107 osób (w tym 95 osób określonych jako odpowiadający na terapię biologiczną i 12 nieodpowiadających). Chorzy byli poddawani terapii biologicznej przeciwciałami monoklonalnymi infliksymabem i adalimumabem zgodnie z aktualnym schematem leczenia. Oceny skuteczności terapii dokonywano w 12 tygodniu leczenia zgodnie z wytycznymi. Wykluczono inne możliwe przyczyny nieskuteczności terapii.

Badanie ekspresji w wycinkach śluzówki jelita przeprowadzono u 18 pacjentów i 11 osób z grupy kontrolnej.

Hodowle komórkowe badano w grupie 14 osób i 8 kontroli.

Badania uzyskały pozytywną zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu.

Następnie bardzo dokładnie opisano stosowany sprzęt laboratoryjny oraz kolejne etapy i zastosowane metody: izolacji DNA z leukocytów krwi obwodowej, izolację RNA z biopsatów nabłonka jelita cienkiego, izolację limfocytów do hodowli komórkowej, izolację RNA z hodowli, ocenę ilościową i jakościową DNA, RNA, rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym, long range PCR, projektowanie i optymalizację starterów, odwrotną transkrypcję, PCR w czasie rzeczywistym, sekwencjonowanie DNA Sangera, przygotowanie bibliotek DNA do sekwencjonowania NGS, analizę bioinformatyczną, prowadzenie hodowli komórkowych *in vitro*, test cytotoksyczności, inkubację z przeciwciałem anti-TNF (infliksymab), ocenę apoptozy.

Uzyskane wyniki badań poddano rzetelnej analizie statystycznej.

Narzędzia badawcze zostały dobrane prawidłowo, pozwalając na realizację postawionych celów badawczych.

#### IV. Wyniki

Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w formie opisowej i tabelarycznej oraz wzbogacone o ryciny.

Zostały one przedstawione konsekwentnie i w miarę możliwości syntetycznie pod względem merytorycznym i graficznym. Uzyskane wyniki odpowiadają postawionym celom badawczym pracy.

#### V. Dyskusja

Dyskusja przedstawiona została na 9 stronach. Dowodzi ona gruntownej wiedzy dotyczącej omawianego zagadnienia, znajomości aktualnego piśmiennictwa oraz umiejętności interpretacji

wyników własnych w odniesieniu do danych z literatury. Dyskusja została przeprowadzona logicznie i konsekwentnie.

## VI. Podsumowanie wyników i wnioski końcowe

Rozprawę wieńczą wnioski wynikające z uzyskanych wyników i odpowiadające na postawione cele badawcze.

Potwierdzają one udział czynników molekularnych w pierwotnym braku odpowiedzi na leczenie anty-TNF.

-analiza genetyczna 23 wybranych genów z użyciem amplikowanych bibliotek NGS wykazała 11 zidentyfikowanych wariantów SNP w genach *FCGR3A*, *TNFRSF1B*, *FAS*, *IL1B* i *IL1R* co korelowało z pierwotnym brakiem odpowiedzi na leczenie anty-TNF. Ze względu na małą grupę badania te wymagają potwierdzenia. Nie zidentyfikowano nowych wariantów najczęściej powiązanych z aktywnością farmakogenów. Zatem na podstawie otrzymanych wyników nie można jednoznacznie wskazać molekularnego markera braku odpowiedzi na leczenie anty-TNF.

-na podstawie analizy profilu ekspresji w biopsjach śluzówki jelita zaobserwowano różnice w ekspresji mRNA genów *FCGR3A*, *TNFRSF1B*, *ADAM17*, *IL1B* w poszczególnych grupach pacjentów nieodpowiadających w porównaniu do odpowiadających i kontroli wskazując na ich potencjalny udział w braku odpowiedzi na leczenie anty-TNF ale jednocześnie sugerują wieloczynnikowy mechanizm tego zjawiska.

-na podstawie obserwacji badań inkubacji limfocytów T z przeciwciałem anty-TNF, nie stwierdzono istotnego wpływu infliksymabu na proces apoptozy. Mimo tego zaobserwowano istotne statystycznie różnice ekspresji genów związanych z tym procesem *TNFRSF1B* i *FAS* a także *FCGR3A*.

- działanie na komórki hodowli przeciwciałami anty-TNF reguluje w zróżnicowany sposób w zależności od grupy badanej ekspresję genów *FAS*, *TNFRSF1B* i *FCGR3A*.

## VII. Piśmiennictwo

Piśmiennictwo jest bogate, obejmuje 165 trafnie wybranych pozycji, z czego znaczną większość stanowi aktualne piśmiennictwo zagraniczne.



### **Podsumowanie i uwagi końcowe**

Rozprawa doktorska stanowi wyczerpujące i przede wszystkim praktyczne opracowanie ważnego zagadnienia, dając jednocześnie podstawy do dalszego rozwijania tego tematu.

Mimo że uzyskane wyniki rozprawy nie odpowiadają jednoznacznie na postawione pytanie czy wybrane geny i ich aktywność wpływają na skuteczność leczenia biologicznego, wskazują kierunek przyszłych badań.

Układ pracy jest przejrzysty, plan badania przemyślany, wyniki zostały przedstawione rzetelnie a następnie logicznie przeanalizowane. Ponadto Doktorant wykazał się dbałością o estetykę i poprawność językową w przygotowaniu manuskryptu.

**Przedstawiona praca spełnia kryteria określone w ustawie o tytułach i stopniach naukowych, co upoważnia mnie do przedłożenia wniosku Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Mając na uwadze powyższe argumenty a szczególnie wymiar praktyczny, zwracam się z uprzejmą prośbą do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN o możliwość wyróżnienia przedstawionej mi rozprawy doktorskiej.

*Agnieszka Osmola-Mańkowska*

dr hab. n. med.  
Agnieszka Osmola-Mańkowska  
specjalista dermatolog i wenerolog  
7568031