



Uniwersytet Rzeszowski  
Kolegium Nauk Medycznych  
Instytut Nauk Medycznych

Dr hab. n. med. Anna Żaczek, prof. UR

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Gality**  
**pt. „Aspekty funkcjonalne, genetyczne i epigenetyczne naprawy DNA w**  
**reumatoidalnym zapaleniu stawów”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje cykl powiązanych tematycznie publikacji, których Doktorant jest pierwszym autorem. Z czterech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, dwie są opublikowane, natomiast dwie są przedstawione w formie manuskryptów, z których jeden jest zaakceptowany do druku. Wszystkie prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej są doświadczone, a o ich wysokim poziomie świadczy sumaryczny współczynnik IF (14,157).

Rozprawę otwierają: informacja dotycząca źródła finansowania badań (Grant NCN - OPUS 13), informacja o współpracy z Kliniką Reumatologii i Zakładem Chemii i Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz zestawienie dotychczasowego dorobku naukowego Doktoranta. Poza pracami wchodzącymi w skład dysertacji na dorobek naukowy Doktoranta składa się aż 18 dodatkowych publikacji oraz liczne komunikaty zjazdowe prezentowane podczas konferencji krajowych i zagranicznych. Całość rozprawy zamykają oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, dotyczące ich wkładu pracy w powstanie poszczególnych publikacji. Nie ma wątpliwości, że wkład pracy mgr Grzegorza Gality był dominujący w każdej publikacji składającej się na ocenianą rozprawę. Imponujący całociowy IF dorobku naukowego Doktoranta (94,551) świadczy o Jego dojrzałości naukowej, a przedłożona do recenzji dysertacja ma zwieńczyć ten etap kariery naukowej tytułem doktora.

Ponieważ wyniki będące przedmiotem rozprawy w przeważającej części są już opublikowane moje zadanie jako recenzenta było znacznie ułatwione bowiem wyniki podlegały uprzednio ocenie przez recenzentów czasopism. Praca doktorska obejmuje: wstęp, cel pracy, materiały i metody, podsumowanie i wyniki oraz wnioski, streszczenie

(także w języku angielskim) i literaturę uzupełniającą (21 pozycji). Takie opracowanie rozprawy stanowi doskonale wprowadzenie do tematu przed lekturą publikacji oryginalnych.

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) to choroba autoimmunologiczna charakteryzująca się przewlekłym stanem zapalnym stawów i otaczających tkanek. Spośród wielu czynników związanych z rozwojem choroby takich jak: wiek, płeć, zanieczyszczenie powietrza, styl życia, w tym palenie tytoniu, otyłość, zmiany w mikrobiomie, choroby przyzębia i inne, podłoże genetyczne wydaje się być jednym z ważniejszych czynników ryzyka. Wśród potencjalnych czynników genetycznych wymienia się występowanie tzw. alleli HLA-DRB1 oraz polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs, ang. single nucleotide polymorphisms) w genach, których produkty są zaangażowane w patogenezę RZS. Cechą charakterystyczną RZS jest deregulacja systemu odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR, ang. DNA damage response) oraz wrażliwość komórek na czynniki uszkadzające, co wpływa na niestabilność genomu, może też skutkować zwiększoną częstością występowania nowotworów u pacjentów chorych na RZS w stosunku do osób zdrowych.

Celem przedłożonej rozprawy doktorskiej była ocena genetycznych, epigenetycznych i funkcjonalnych mechanizmów naprawy DNA w RZS. System DDR jest szlakiem transdukcji sygnału o uszkodzeniu i składa się z naprawy DNA, która odbywać się może za pomocą różnych szlaków naprawczych, których krótką charakterystykę Doktorant zawarł we „Wstępie”. Są to: system naprawy przez wycinanie zasad (BER, ang. base excision repair), system naprawy przez wycinanie nukleotydów (NER, ang. nucleotide excision repair), system naprawy podwójnych pęknięć DNA (DSB, ang. double-strand break) na drodze homologicznej rekombinacji (HRR, ang. homologous recombination repair) i drodze łączenia niehomologicznych końców (NHEJ, ang. non-homologous end joinig). Cel pracy wpisuje się w globalny trend poszukiwania markerów i ukierunkowanych terapii aby skutecznie i szybko rozpoznać chorobę i zastosować efektywne leczenie. Wpisuje się też w tematykę badawczą zespołu prof. Popławskiego nad systemami naprawy uszkodzeń DNA. Cel zrealizowano poprzez: określenie stopnia uszkodzeń komórek krwi obwodowej (PBMC, ang. peripheral blood mononuclear cells) na różne czynniki, określenie efektywności naprawy DNA w tych komórkach po uszkodzeniu, analizę ekspresji genów związanych ze szlakami napraw DNA (BER, HR i NHEJ), analizę ekspresji mikroRNA-miR-155, określenie poziomu globalnej metylacji DNA, ocenę zmienności genetycznej w obrębie genów systemu naprawy uszkodzeń DNA oraz ocenę korelacji pomiędzy naprawą uszkodzeń DNA a tłem genetycznym i epigenetycznym.

Przedłożone publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są spójne tematycznie, wydają się być dobrze zaplanowaną kontynuacją badań. Badania przedstawione w artykule opublikowanym w *Journal of Clinical Medicine*, 2020 (IF 4,242)

wykazały wyższy poziom endogennych uszkodzeń komórek PBMC pochodzących od osób chorych RZS w stosunku do osób zdrowych po ekspozycji na czynniki uszkadzające DNA oraz różną kinetykę naprawy. Upośledzona, nieefektywna naprawa DNA może przyspieszać starzenie się komórek PBMC i przyczyniać się do fenotypu RZS. Badania nie rozstrzygnęły czy upośledzona naprawa DNA jest konsekwencją choroby czy markerem podatności na RZS otwierając tym drogę do dalszych eksperymentów. Ponadto, nie wykazano różnic w poziomie endogennych uszkodzeń pomiędzy pacjentami z wysoką i niską aktywnością choroby, co wyjaśniono nieliczną grupą badawczą (20 osób z RZS vs 20 zdrowych). Ciekawi mnie czy były przeprowadzone lub są w planach badania na większej grupie badawczej aby wykazać te różnice.

Ocena zmienności genetycznej w obrębie genów systemów naprawy uszkodzeń BER, NER, HR i NHEJ była następnym etapem prac w ramach rozprawy doktorskiej. Badania w tym zakresie stanowią przedmiot publikacji w *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, IF 6,208. Wskazano polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w genach kodujących białka biorące udział w systemach naprawy DNA, które są związane z predyspozycją do występowania RZS i mogą być uważane za potencjalne markery tej choroby. Na uwagę zasługuje fakt, że badanie to jest pierwszym, które wykazało związek pomiędzy występowaniem RZS a SNP NHEJ/HR. Badania objęły 100 osób chorych na RZS i 100 osób zdrowych i dotyczyły 28 polimorfizmów w 19 genach kodujących białka związane z różnymi systemami napraw DNA (10 BER, 4 DSB, 1 BER/DSB, 3 NHEJ, 9 HR, 1 MMR). Wykazano, że polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w genach kodujących białka biorące udział w systemach naprawy DNA są związane z predyspozycją do występowania RZS. Uwagę mam jedynie do wymieniaania wszystkich genów i polimorfizmów w tekście rozprawy, co sprawia, że zdania są bardzo długie i przez to mniej czytelne. Zdecydowanie lepiej byłoby umieścić te nazwy w tabelach, tak jak są one przedstawione w opublikowanym artykule.

Kolejne dwie prace składające się na podstawę rozprawy doktorskiej, przyjęta do druku w *Archives of Medical Sciences*, 2023 (IF 3,707) oraz dotychczas nieopublikowana w formie manuskryptu, dotyczą odpowiednio szczegółowej analizy szlaku naprawy BER oraz analizy dwóch szlaków związanych z naprawą podwójnych pęknięć DNA (DSB) - HRR i NHEJ u pacjentów chorych na RZS. W pierwszej kolejności zbadano wrażliwość komórek PBMC na wodoronadtlenek tetr-butylu (TBH) indukujący system naprawy BER oraz na bleomycynę (BLM) indukującą powstawanie podwójnych pęknięć usuwanych przez system HRR lub NHEJ. W obu przypadkach stwierdzono wyższą wrażliwość komórek PBMC na czynniki uszkadzające oraz niższą wydajność naprawy DNA w komórkach PBMC u pacjentów w stosunku do osób zdrowych. Wykazano także interakcję pomiędzy nieefektywną naprawą oksydacyjnych uszkodzeń DNA i polimorfizmem genu UNG oraz

niższą ekspresję kluczowych genów systemu BER (MUTH, NEIL3, UNG), która nie była spowodowana zmianą profilu globalnej metylacji DNA. W przypadku naprawy podwójnych pęknięć stwierdzono powiązanie dwóch SNP genów RAD51 i RAD51B z fenotypem RZS. Natomiast analiza poziomu ekspresji wykazała deregulację ekspresji genów systemu DSBs i miR-155 u pacjentów chorych na RZS w porównaniu do grupy kontrolnej. Parametr RepEff, wyrażający względną wydajność naprawy DNA, okazał się najbardziej odpowiedni dla identyfikacji RZS, a połączenie go z parametrami SNP RAD51 i RAD51B powoduje wzrost zdolności predykcyjnej. Upośledzona naprawa podwójnych pęknięć DNA w RZS może być powiązana ze zmiennością genetyczną genów naprawy DSB, a także poziomem ekspresji. Dyskusję uzyskanych wyników kończy konkluzja na temat konieczności dalszych badań.

Proszę Doktoranta o krótką charakterystykę obiecujących kierunków badawczych, szczególnie tych, które miałyby na celu wyjaśnienie mechanizmu zależności pomiędzy nieefektywną naprawą DNA, a zmiennością genetyczną oraz tego czy zależność ta jest bezpośrednia czy pośrednia. Ponadto, w związku z rozwojem medycyny spersonalizowanej, mam pytanie o to jak w przyszłości mogłaby wyglądać diagnostyka i leczenie RZS w odniesieniu do terapii obecnie stosowanej. Ciekawi mnie też czy ewentualna dieta bogata w przeciwutleniacze, łagodząc skutki stresu oksydacyjnego na poziomie DNA u osób o obniżonej efektywności naprawy, mogłaby realnie zmniejszać ryzyko choroby lub jej skutki.

Tytuł dysertacji odzwierciedla postawiony cel i jest adekwatny do przedmiotu rozprawy. Również tytuły publikacji, stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, odpowiadają tematowi rozprawy, co więcej, niosą informacje o przedmiocie badań. „Wstęp” rozprawy stanowi przegląd aktualnego stanu wiedzy dotyczącego podłoża reumatoidalnego zapalenia stawów. Literatura uzupełniająca liczy 21 pozycji i zacytowana jest poprawnie. Publikacje wchodzące w skład rozprawy również obejmują „Wstęp” oraz cytowane piśmiennictwo, odpowiednio 13, 28, 42 i 25 pozycji i świadczą o wyczerpującym zgłębieniu tematu oraz dużej wiedzy Doktoranta pomimo, że niektóre pozycje cytowane są zarówno w rozprawie jak i publikacjach wchodzących w jej skład, co jest uzasadnione.

Układ prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej jest typowy dla prac eksperymentalnych. W rozdziale „Materiały i metody” rozprawy zawarta jest informacja o uzyskanym pozwoleniu Komisji Bioetycznej na badania oraz o kryteriach rekrutacji pacjentów i osób do grup kontrolnych. Według podanych tu informacji w badaniach wzięło udział 180 pacjentów chorych na RZS oraz 180 osób zdrowych. Według poszczególnych publikacji w badaniach wzięło udział odpowiednio 20, 100, 30 i 45 pacjentów oraz tyle samo osób zakwalifikowanych do grup kontrolnych. Na wyjaśnienie zasługuje fakt czy grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe, jak wnioskuję z lektury publikacji, czy „chorzy bez objawów przewlekłych stanów zapalnych”, jak czytamy w rozdziale „Materiały i metody” rozprawy.

Ponadto, ciekawi mnie czy do kolejnych badań, będących przedmiotem kolejnych publikacji rekrutowane były kolejne osoby? Czy materiał pozyskany od osób rekrutowanych poprzednio wykorzystywany był w kolejnych badaniach? Nie mam żadnych zastrzeżeń dotyczących zastosowanych metod i technik badawczych, świadczą one o opanowaniu przez Doktoranta bogatego warsztatu metodycznego. Do oceny wrażliwości komórek PBMC na czynniki uszkodzające oraz efektywności naprawy zastosowano alkaliczną wersję testu kometowego. Dla oceny ekspresji mikroRNA hsa-miR-155 wykorzystano komercyjny test TaqMan MicroRNA Assay. Profil ekspresji genów związanych z systemami napraw analizowano przy użyciu PrimeTime qPCR Assay lub TaqMan® Gene Expression Assay w odniesieniu do właściwych genów referencyjnych. Globalną metylację oceniono za pomocą zestawu MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit, a polimorfizmy genów określono testami TaqMan® SNP Genotyping Assays. Na szczególne uznanie zasługują zastosowane statystyczne metody i narzędzia analizy wyników niezbędne dla wyciągania uprawnionych wniosków. Choć rozprawa jest pozbawiona graficznego przedstawienia wyników nie mam wątpliwości, że Doktorant posiada takie umiejętności o czym świadczą liczne tabele i starannie wykonane ryciny zawarte w publikacjach wchodzących w skład rozprawy (łącznie 15 tabel i 10 rycin). Rozdziały „Podsumowanie i wyniki” w rozprawie oraz „Dyskusja” w poszczególnych publikacjach napisane są bardzo dojrzałe, z doskonałą znajomością tematu. Doktorant krytycznie odnosi uzyskane wyniki do danych literaturowych oraz stawia w pełni uprawnione wnioski.

Doktorant nie ustrzegł się w swojej pracy drobnych błędów edycyjnych takich jak błędy interpunkcyjne (np. brak kropek, często na końcu zdań), nazwa gatunkowa bakterii nie zapisana kursywą (str. 12), niepoprawne sformułowania (np. „poprzez odpowiedź śmierci”) lub zapożyczenia z języka angielskiego, niepoprawne odmiany wyrazów, które w większości uważam za błędy literowe (w tym „cehę” na str. 22) oraz drobne braki w spisie literatury uzupełniającej (np. w pozycji 17). Większym zaniedbaniem natomiast było stosowanie przez Doktoranta w tekście rozprawy niewyjaśnionych uprzednio skrótów. Zamieszczenie wykazu skrótów, a przynajmniej ich rozwinięcia w języku angielskim, byłoby całkiem zasadne.

Powyższe niedociągnięcia nie umniejszają wartości przedłożonej rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko. Uzyskane rezultaty badań są w pełni oryginalnymi osiągnięciami naukowymi o charakterze twórczym. Wyrazy uznania kieruję nie tylko do Doktoranta ale i Promotora, prof. Tomasza Popławskiego.

Niniejszym stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca doktorska spełnia wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego

do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Grzegorza Gality do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na rangę podjętego problemu i wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników wnoszę o wyróżnienie dysertacji stosowną nagrodą. Wartość rozprawy dodatkowo podnosi fakt, że trzy prace wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane w wysoko punktowanych czasopismach naukowych, a mgr Grzegorz Galita jest ich pierwszym autorem.



Rzeszów, 13 września 2023

Dr hab. n. med. Anna Żaczek, prof. UR

---