



Prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
Instytut Biologii Medycznej PAN

Dziękuję
Wydział Dziekanat
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego
wpłynęło dn. 20.12.2016
podpis l.dz. 7582

Ocena pracy doktorskiej mgr Anny Walczak „Znaczenie ekspresji oraz polimorfizmów genów cytokin dla występowania i progresji nieswoistych chorób zapalnych jelit oraz raka jelita grubego”.

Zapalenie jelita grubego, choroba Leśniowskiego-Crohna oraz nieswoiste zapalenie okrężnicy zaliczamy do nieswoistych chorób zapalnych jelit cechujących się zmianami zapalnymi i owrzodzeniami w obrębie przewodu pokarmowego. Stany zapalne jelit to także jeden z ważniejszych czynników endogennych raka jelita grubego. Wszystkie te choroby charakteryzują się nieswoistymi objawami utrudniającymi przeprowadzenie szybkiej diagnostyki na wczesnym etapie choroby. Niewątpliwie w indukcji i progresji tych chorób znaczącą rolę odgrywają chroniczne stany zapalne, które mogą wynikać z nieprawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego w tym z nieprawidłowej mikroflory jelitowej. Wśród czynników przyczyniających się do powstawania chorób zapalnych jelit wymienia się zaburzenia immunologiczne prowadzące do nieprawidłowej stymulacji limfocytów i makrofagów oraz innych komórek immunokompetentnych. Kluczową rolę w regulacji stanów zapalnych w organizmie odgrywają cytokiny a ich nadmiar lub brak może prowadzić do niekontrolowanego uszkodzenia tkanek. Znaczenie cytokin w odpowiedzi zapalnej organizmu oraz rola chronicznego stanu zapalnego w ww. schorzeniach uzasadniają podjętą przez Doktorantkę tematykę badań, poszukiwania zależności pomiędzy polimorfizmami wybranych cytokin, poziomem ich ekspresji oraz występowaniem chorób jelita grubego. Niewątpliwie, sprawna realizacja projektu była możliwa dzięki świetnemu warsztatowi naukowemu zespołu prof. Ireneusza Majsterka, a dostęp do bardzo dobrze dobranych, licznych grup kontrolnej i badanej gwarantowały rzetelną weryfikację postawionej hipotezy badawczej.

Układ tekstu rozprawy jest tradycyjny. Część doświadczalna jest poprzedzona wstępem literaturowym napisanym ładnym językiem naukowym, wprowadzającym czytelnika kolejno w definicje i klasyfikacje raka jelita grubego oraz nieswoistych chorób zapalnych. W dalszej części



Doktorantka opisuje rolę cytokin w rozwoju procesu zapalnego oraz w rozwoju nowotworów. Ze względu na postawioną hipotezę badawczą Pani mgr Walczak pokazuje udowodnione zależności pomiędzy zaburzeniami w produkcji cytokin a chronicznym zapaleniem śluzówki jelit. W tej części wstępu Doktorantka pokazała także zależności pomiędzy stanem zapalnym jelit, generowaniem wolnych rodników o potencjale genotoksycznym oraz procesami nowotworzenia. Uważam, że część teoretyczna pracy została przygotowana w sposób świadczący o bardzo dobrej znajomości tematyki pracy i zapoznaje czytelnika ze wszystkimi elementami niezbędnymi dla zrozumienia pozostałych części pracy. Prosiłbym tylko Doktorantkę o kilka drobnych wyjaśnień związanych z przedstawionymi we wstępie zagadnieniami. **Z czego wynika aż 4-krotny wzrost zachorowalności na raka jelita grubego (str. 5) w ciągu ostatnich 35 lat? Na czym polega działanie ochronne palenia tytoniu (str. 14) we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego? Czy zmiany w mikroflorze jelitowej są przyczyną czy skutkiem nieswoistych chorób zapalnych jelit? Czy próbowano w tych schorzeniach „transplantacji” mikroflory jelitowej w celach terapeutycznych?**

Cele pracy są jasno sformułowane i mają swoje bezpośrednie odzwierciedlenie w prezentowanych wynikach. **Brakuje mi natomiast uzasadnienia dlaczego do badań wybrano *IL-8*, *IL-13* i *MCP-1* skoro w regulacji stanu zapalnego większe znaczenie mają np. *IL-10* (przeciwzapalna) czy *IL-6* (prozapalna). Co zadecydowało o wyborze konkretnych polimorfizmów badanych w prezentowanej pracy?**

W rozdziale „Materiały i Metody” Doktorantka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na podkreślenie zasługują liczne, bardzo dobrze scharakteryzowane grupy badawcze oraz grupa kontrolna. Metody badań zostały dobrane prawidłowo dla realizacji postawionych celów pracy. Na podkreślenie zasługuje przeprowadzone przez Doktorantkę potwierdzenie specyficzności produktu powstającego na matrycy cDNA poprzez przygotowanie krzywych topnienia. **Czy Doktorantka rozważała zastosowanie w oznaczeniach ilościowych którejs z metod wykorzystujących sondę rozpoznającą powstający produkt amplifikacji (np. TaqMan) zamiast barwnika interkalującego pomiędzy nici DNA?**

Otrzymane w czasie realizacji badań wyniki dowodzą skutecznej realizacji ambitnych celów pracy. Przedstawiona dokumentacja naukowa oraz przeprowadzona analiza statystyczna



wyników dowodzi realizacji poszczególnych etapów pracy i świadczy o bardzo dobrym, metodycznym przygotowaniu autorki. W pierwszej części badań Doktorantka zastosowała metodę PCR-RFLP dla określenia częstości polimorfizmów w obszarach promotorowych genów *IL-8*, *IL-13* oraz *MCP-1* w nieswoistych chorobach zapalnych jelit oraz w raku jelita grubego. Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały istotną korelację pomiędzy genotypami TA i AA polimorfizmu -251 *IL-8* a występowaniem wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Zależność taką zaobserwowano również dla pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna oraz z rakiem jelita grubego. Podobne zależności Doktorantka wykazała dla genotypu CT i TT -1112 genu *IL-13* obserwując statystycznie znaczące częstości ich występowania u pacjentów z WZJG, chorobą L-C oraz RJG. Trzeci z badanych polimorfizmów występujący w regionie powyżej genu *MCP-1* (-2518 AG) występował z podobną częstością w grupach badanych i grupie kontrolnej z wyjątkiem pacjentów z rakiem jelita grubego, gdzie był nadreprezentowany w sposób znamieny statystycznie. Ze względu na obecność badanych polimorfizmów w potencjalnych obszarach regulatorowych genów cytokin, w dalszej części badań, Doktorantka oznaczyła poziom ekspresji ww. cytokin u pacjentów grup badanych i kontrolnej. Przeprowadzone analizy wykazały statystycznie znamieny wzrost poziomu ekspresji *IL-8* i *MCP-1* oraz tendencję wzrostową dla *IL-13* we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego, podniesiony poziom badanych interleukin w chorobie L-C oraz wzrost poziomu ekspresji wszystkich cytokin u pacjentów z RJG. *IL-8* i *IL-13* to cytokiny pełniące odmienne funkcje w procesie zapalnym. **Jak wytłumaczyć równoczesny wzrost ekspresji obu tych interleukin w RJG czy chorobie L-C ?** Doktorantka przeprowadziła analizę ekspresji poszczególnych genów pod kątem związku z przebiegiem choroby i zaobserwowała, że ekspresja *IL-8* oraz *MCP-1* spada a *IL-13* rośnie wraz ze stopniem zaostrzenia stanu chorobowego u pacjentów z chorobą L-C. Przeprowadzone analizy wykazały także korelację pomiędzy poziomem ekspresji cytokin a obrazem klinicznym nieswoistych chorób zapalnych jelit oraz raka jelita grubego. Jeśli badany polimorfizm zlokalizowany w potencjalnym regionie promotorowym genu wpływa na jego ekspresję, można przypuszczać, że do sekwencji w której występuje wiąże się jakiś czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję genu. **Czy w obszarze badanych polimorfizmów znajdują się miejsca wiążące znane czynniki transkrypcyjne i czy warianty polimorficzne zmieniają siłę ich wiązania do DNA ?**



Dyskusja pracy została napisana w sposób bardzo dojrzały, a Doktorantka krytycznie odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych. Opisuje także rolę badanych cytokin oraz polimorfizmów w różnych jednostkach chorobowych. Ta część pracy niewątpliwie uzasadnia wybór badanych przez Doktorantkę cytokin i polimorfizmów w nieswoistych chorobach zapalnych jelit oraz raku jelita grubego.

Wnioski wyciągnięte przez autorkę są w pełni uprawnione i mają całkowite pokrycie w przedstawionych danych eksperymentalnych.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Anny Walczak uważam, że ambitne cele rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i wartościowe. **Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Anny Walczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium



Prof. dr hab. Jarosław Dziadek