



Łódź, dnia 31.08.2020 r.

**CENTRUM
ZAPOBIEGANIA
ZAGROŻENIOM
BIOLOGICZNYM**

Wydział Biologii
i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

dr hab. Michał Bijak, prof. UŁ
Centrum Zapobiegania Zagrożeniom Biologicznym
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Małgorzaty Aurelii Pietrusińskiej pt.:
„Ekspresja wybranych microRNA w osoczu u pacjentów z astmą – hsa-miRNA-224, hsa-
miRNA-339-5p, hsa-miRNA-382”

Promotor pracy – dr hab. n. med. Tadeusz Pietras, prof. UMED

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska ma typowy dla rozpraw doktorskich układ: obszerny wstęp uzasadniający założenia pracy, jasno sformułowane cele, dokładny opis metodyki badawczej, szczegółowe omówienie wyników oraz interesującą i dojrzałą dyskusję.

Astma czyli przewlekła choroba układu oddechowego charakteryzuje się przewlekłym stanem zapalnym prowadzącym do nadmiernego kurczenia się oskrzeli, co z kolei powoduje występowanie takich objawów, jak świszczący oddech, duszność, uczucie ściskania w klatce piersiowej czy kaszel. Na astmę choruje ok. 5% Polaków, jest ona jedną z najczęstszych chorób chronicznych. W rozwoju astmy wyróżnić można wiele czynników, a wśród nich także czynniki genetyczne i epigenetyczne. W większości przypadków przyczyna choroby jest nieznana i trudno określić najlepszy sposób zapobiegania jej rozwojowi. Dotychczasowe badania naukowe wskazują niewielką liczbę genów, które są związane z częstością występowania przypadków astmy. W związku z tym niezbędne są dalsze prace badawcze zmierzające do identyfikacji kolejnych czynników molekularnych i ich wpływu na tę chorobę.

Kierownik: dr hab. Michał Bijak, prof. UŁ
tel. +48 42 635 43 36
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: michal.bijak@biol.uni.lodz.pl

 www.biol.uni.lodz.pl

I właśnie, przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani Małgorzaty Pietrusińskiej, poświęcona jest molekularnym badaniom patomechanizmów astmy, obejmującym ocenę poziomu ekspresji wybranych cząsteczek microRNA w osoczu pacjentów względem grupy kontrolnej osób zdrowych.

MikroRNA (miRNA) są klasą małych, niekodujących cząsteczek RNA zawierających od 21 do 24 nukleotydów, które w warunkach prawidłowych działają jako ujemne regulatory ekspresji docelowego mRNA na poziomie potranskrypcyjnym. Dojrzałe cząsteczki mikroRNA zachowują się jak potranskrypcyjne regulatory ekspresji genów dzięki parowaniu zasad z cząsteczkami mRNA. Cząsteczki miRNA hybrydują z kompleksem indukującym wyciszanie RNA (RISC) w regionie 3'-UTR. Regulacja genu przez kompleks RISC odbywa się na drodze połączenia pomiędzy regionem w miRNA (2-7 oraz 8 nukleotydem) a regionem 3'-UTR w mRNA. Istnieje coraz więcej dowodów wskazujących kluczową rolę miRNA w wielu procesach biologicznych takich jak: wzrost komórek, różnicowanie tkankowe, proliferacja komórek, rozwój zarodkowy czy apoptoza. Cząsteczki miRNA odgrywają bardzo ważną rolę również w przekazywaniu komórkowym. Mutacje miRNA, dysfunkcje czy zaburzenia regulacji miRNA mogą wpływać na rozwój różnych chorób. Aktualnie, znane jest ponad 70 chorób, które są związane z zaburzeniami ekspresji cząsteczek mikroRNA.

Praktyczne wykorzystanie cząsteczek miRNA jako markerów służących do nieinwazyjnego wykrywania wczesnych symptomów schorzenia, jak i monitorowania stanu zaawansowania choroby jest dużym wyzwaniem. Jednak badania prowadzone w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie wskazują właśnie te cząsteczki jako przełom w molekularnej diagnostyce chorób. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę w ramach przedstawionej dysertacji wpisują się w ten nurt naukowy, co ze względu na możliwość praktycznego zastosowania zasługuje na szczególną pochwałę.

Za cel główny realizowanych badań Doktorantka postawiła sobie określenie poziomu ekspresji wybranych cząsteczek miRNA (hsa-miRNA-224, hsa-miRNA-339-5p oraz hsa-miRNA-382) w materiale biologicznym pobranym od pacjentów chorujących na astmę. W związku z założonym celem pracy Doktorantka sformułowała 4 szczegółowe pytania badawcze, na które uzyskała odpowiedź w trakcie realizacji swoich badań.

Liczący 34 stron Wstęp stanowi szczegółowy opis zagadnień dotyczących astmy ze szczególnym naciskiem na jej patogenezę, objawy oraz leczenie. Należy podkreślić, że szczegółowe opisy zostały wzbogacone licznymi tabelami oraz ilustracjami graficznymi. Na szczególne wyróżnienie zasługuje rycina nr 5, która doskonale przedstawia mechanizmy

immunologiczne zachodzące w patogenezie astmy w nabłonku dróg oddechowych. W mojej ocenie najistotniejszy we wstępie jest rozdział „3.3 Astma – od objawów do leczenia” natomiast rozdział 3.2 dotyczący GINA – Global Initiative for Asthma nie ma zbyt istotnego znaczenia w odniesieniu do badań prowadzonych w pracy, jednak ma on zapewne dużą wartość dla klinicystów praktycznie zajmujących się astmą. Doktorantka bardzo płynnie porusza się w zagadnieniu związanym z miRNA, czego dowodem jest bardzo dobrze przygotowany rozdział „3.5. MicroRNA – definicja, biogeneza, funkcje”.

Badania przeprowadzone były na próbkach pobranych od 30 pacjentów, którzy pochodzili z Kliniki Pulmonologii i Alergologii lub Poradni Pulmonologicznej USK nr 1 im. N. Barlickiego w Łodzi. Grupę kontrolną stanowiło 20 ochotników. W opisie grup brakuje informacji na temat zgody właściwej Komisji Bioetycznej. Dodatkowo brakuje szczegółowej charakterystyki obu grup wraz z porównaniem ich homologii względem podstawowych parametrów.

W części eksperymentalnej Doktorantka bazuje na metodzie łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dokonując analiz przy użyciu komercyjnych sond hybrydujących typu TaqMan. Jest to najczulsza i najbardziej specyficzna metodyka wykrywania ilości poszczególnych cząsteczek miRNA w materiale biologicznym stąd jej wybór przez Doktorantkę zasługuje na pochwałę. Podczas swoich badań Doktorantka dokonała najpierw badania przesiewowego przy użyciu komercyjnych zestawów TaqMan® Human MicroRNA Array A, które pozwalają na jednoczesną analizę aż 384 transkryptów miRNA w jednej próbce. W mojej ocenie jest to ważne doświadczenie determinujące dalszy przebieg pracy, stąd też wyniki tej analizy powinny się znajdować w sekcji wyniki a nie metody. MiRNA izolowane było bezpośrednio z osocza przy użyciu komercyjnego kitu MirVana, który charakteryzuje się bardzo dobrą wydajnością. Jednak w tym przypadku nasuwa się bardzo ważne pytanie, dlaczego Doktorantka izolowała materiał bezpośrednio z osocza, a nie wykonała wcześniej procedury izolacji egzosomów?, w których ilość miRNA powinna być znacznie większa.

Analiza matematyczna wyników ekspresji genów oraz testy statystyczne zostały odpowiednio dobrane i opisane, a cała analiza statystyczna wraz z opisanymi wynikami stanowi bardzo mocną część pracy.

Uzyskane wyniki zaprezentowano w formie opisowej, tabelarycznej oraz graficznej, co pozwoliło w czytelny sposób przedstawić główne obserwacje dokonane przez Doktorantkę. W pracy Doktorantka wykazała, że w astmie dochodzi do wzrostu ekspresji hsa-miR-224, hsa-miR-339-5p oraz hsa-miR-382. Dodatkowo, dzięki analizom współczynników korelacji,

udało się określić ujemną korelację ekspresji hsa-miR-382 ze stopniem obturacji mierzonym FEV1 oraz ujemną korelację ekspresji hsa-miR-382 ze stopniem kontroli choroby, mierzonym w teście ACQ.

W sekcji dyskusja Doktorantka przedstawia potencjał cząsteczek miRNA jako biomarkerów w molekularnej diagnostyce stanów patologicznych oraz opisuje wyniki dotychczasowych badań nad cząsteczkami hsa-miR-224, hsa-miR-339-5p oraz hsa-miR-382. W mojej ocenie niedosyt budzi brak dopasowania możliwych transkryptów mRNA, na które mogą wpływać te trzy cząsteczki miRNA. Mogło by to zwiększyć potencjał naukowy pracy przez wskazywanie molekularnego mechanizmu zaburzeń obserwowanych w astmie.

Jako ostatni element pracy przedstawione są trzy wnioski, które konkludują badania oraz analizy odnosząc się do głównego celu postawionego w pracy doktorskiej. Wnioski te mają duży potencjał naukowy i kliniczny, dzięki czemu mogą stanowić impuls do dalszych zakrojonych na szeroką skalę badań nad wykorzystaniem miRNA jako biomarkerów do oceny obturacji i przebiegu choroby u pacjentów.

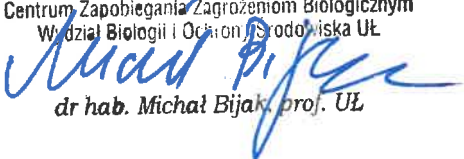
Ogólnie, tak pod względem merytorycznej zawartości, poprawności zaplanowania badań i ich przeprowadzenia, jak również pod względem zaprezentowanej formy pracy, dysertację lek. med. Małgorzaty Aurelii Pietrusińskiej oceniam bardzo dobrze.

Chociaż w całości rozprawa nie budzi zastrzeżeń w zakresie oryginalności tematyki badawczej, postawionych celów badawczych i doboru metodyki badań oraz interpretacji uzyskanych wyników, to jednak, z obowiązku recenzenta, oprócz wskazań znajdujących się powyżej pragnę zwrócić uwagę Doktorantki na drobne uchybienia natury ogólnej:

- nieujednolicony system wyjaśniania skrótów, raz są wyjaśniane przy pierwszym użyciu a raz nie;
- cytacje nie powinny znajdować się w streszczeniu, a system przypisów powinien się zaczynać od numeru 1 we właściwej pracy;
- na stronie 17 w stwierdzeniu, że proces oddychania jest przedstawiony jako funkcja w czasie powinna być podana informacja czego to jest funkcja;
- stwierdzenie „Micro-RNA nie są wybiórcze względem genów, których ekspresję regulują” jest mylące, gdyż sugeruje brak specyficzności cząsteczek miRNA, owszem nie mają one wysokiego poziomu specyficzności jednak nie można stwierdzić, że nie są one wybiórcze w stosunku do transkryptów mRNA;

- zdanie pierwsze w materiałach i metodach „Znanych jest obecnie kilkaset, a nawet kilka tysięcy microRNA, które podlegają aktualnie coraz szerszej analizie” jest nieprecyzyjne;
- w stwierdzeniu „Wykazano silną korelację rozwoju astmy z występowaniem wysokiej ekspresji wielu genów, które są odpowiedzialne między innymi za regulację wydzielania cytokin prozapalnych, mechanizm remodelingu ściany oskrzeli, funkcjonowanie nabłonka dróg oddechowych. Dużą rolę w tym procesie odgrywają niekodujące cząsteczki RNA, w tym microRNA” brakuje odnośnika do tych obserwacji;
- zgodnie z zasadami redakcyjnymi Tabelę podpisujemy nad obiektem;

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska lek. med. Małgorzaty Aurelii Pietrusińskiej pt. „Ekspresja wybranych microRNA w osoczu u pacjentów z astmą – hsa-miRNA-224, hsa-miRNA-339-5p, hsa-miRNA-382” posiada dużą wartość poznawczą i bez wątplenia spełnia warunki określone w przepisach wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce art. 179 (Dz. U. 2018, poz. 1669 Ustawa z dnia 3 lipca 2018 r.). Moje krytyczne uwagi przedstawione w recenzji nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. W związku z czym przekładam Wysokiej Radzie Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie lek. med. Małgorzaty Aurelii Pietrusińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej.

KIEROWNIK
Centrum Zapobiegania Zagrożeniom Biologicznym
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ

dr hab. Michał Bijak, prof. UŁ