

OCENA

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

Promotor: Prof.nadzw.dr hab. n. med. Tadeusz Pietras

Astma oskrzelowa należy do przewlekłych, zapalnych chorób układu oddechowego. Jest chorobą szeroko rozpowszechnioną, dane WHO mówią o ponad 300 milionach osób cierpiących na nią na całym świecie. I pomimo tego, że pierwsze wzmianki o astmie i próbach jej leczenia sięgają czasów faraona Amenhotepa I, czyli ok. 1500 r. przed naszą erą, nadal pozostaje wiele do wyjaśnienia jeśli chodzi o mechanizmy patogenezy astmy, jej diagnostyki i terapii. Dotyczy to szczególnie astmy o ciężkim przebiegu, gdzie wciąż trudno dobrze kontrolować jej przebieg, nadal bowiem, pomimo wielu badań, brakuje biomarkerów stopnia ciężkości astmy, które by dobrze korelowały z nasileniem procesu zapalnego toczącego się w drogach oddechowych, objawami klinicznymi, częstością zaostrzeń, odpowiedzią na stosowane leki, w tym glikokortykoidy. Stąd ciekawą propozycję stanowią micro RNAs, będące krótkimi cząsteczkami RNA o długości 18-25 nukleotydów, nie kodującymi białek, ale mającymi zdolność pełnienia funkcji regulatorowych ekspresji innych genów na poziomie syntezy białka poprzez mechanizm interferencji RNA. Liczne badania wskazują na istotną rolę miRNA w regulacji różnorodnych procesów biologicznych kluczowych dla rozwoju i funkcjonowania organizmu, między innymi proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek. Nieprawidłowa ekspresja miRNA może być przyczyną inicjacji i rozwoju chorób układu krążenia, a także chorób nowotworowych. Dodatkowo wykazano również ich udział w procesie zapalnym, co może wskazywać, że są istotnym czynnikiem w patogenezie astmy oskrzelowej oraz w regulacji odpowiedzi komórek nabłonka oddechowego oraz komórek mięśni gładkich oskrzeli.

Mając powyższe aspekty na względzie należy przyjąć z uznaniem podjęcie się przez lek. med. Małgorzatę Pietrusińską-Miedzińską oceny różnicy ekspresji wybranych miRNA w osoczu pacjentów chorujących na astmę oskrzelową.

Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 96 stron i składa się z 10 części: wstępu, celu pracy, materiału i metod badania, wyników, omówienia wyników i dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim, streszczenia w języku angielskim, wykazu skrótów, spisu rysunków, tabel oraz piśmiennictwa. Praca jest ilustrowana 6 rycinami oraz 20 tabelami. Dysertacja zawiera 113 pozycji prawidłowo dobrane oraz aktualnego piśmiennictwa.

We „Wstępie” (33 strony) Doktorantka w sposób bardzo szczegółowy przedstawia zagadnienia związane z tematem jej pracy. Kolejno przedstawia definicję, objawy podmiotowe i przedmiotowe, diagnostykę i leczenie astmy. Znaczącą uwagę poświęca patogenezie tej choroby. Dalsza część wstępu poświęcona jest zagadnieniom, które są przedmiotem dysertacji a mianowicie definicji microRNA ich biogenezie i funkcji. Wstęp stanowi bardzo dobre wprowadzenie do tematu badań własnych Autorki, aczkolwiek wydaje się, że w stosunku do objętości całej pracy powinien być nieco skrócony.

Następnie Doktorantka przedstawia „Cel pracy”: „Ocena różnicy ekspresji wybranych microRNA w osoczu pacjentów chorujących na astmę względem grupy kontrolnej osób zdrowych”. Tak postawiony cel pracy pozwolił na sformułowanie 4 pytań badawczych:

1. Czy obserwowana jest różnica w ekspresji miR-224, miR-339-5p i miR-382 w osoczu u pacjentów chorujących na astmę w porównaniu do grupy osób zdrowych?
2. Czy istnieje zależność między ciężkością obturacji, mierzonej za pomocą wskaźnika FEV₁, a ekspresją miR-224, miR-339-5p i miR-382 w osoczu u pacjentów chorujących na astmę?
3. Czy obserwowana jest różnica w ekspresji miR-224, miR-339-5p i miR-382 w osoczu u pacjentów chorujących na astmę w zależności od stopnia kontroli astmy ocenianego przy pomocy ACQ-T?
4. Czy obserwowana jest różnica w ekspresji miR-224, miR-339-5p i miR-382 w osoczu u pacjentów chorujących na astmę w zależności od wielkości przyjmowanej dawki ICs?

W rozdziale „Materiał i metody” (13 stron) Doktorantka charakteryzuje grupy badanych chorych oraz przedstawia metodykę badań. Przedstawia plan badania podzielony na badanie wstępne, w którym oceniano po trzy próbki z grupy badanej i z grupy kontrolnej, co pozwoliło na wyodrębnienie trzech microRNA, a następnie badanie właściwe oceniające różnice w ekspresji wybranych microRNA w grupie badanej i w grupie kontrolnej. Badaną grupę stanowiło 30 pacjentów chorujących na astmę, a grupę kontrolną 20 osób zdrowych. Doktorantka charakteryzuje demograficznie i klinicznie obie grupy, podaje kryteria wykluczenia z badania, dokonuje podziału grupy badanej na poszczególne podgrupy, przedstawia oceniane parametry. W metodyce badań, wstępnego i właściwego, podaje, niestety dość lakonicznie, metody izolacji, odwrotnej transkrypcji i preamplifikacji. Liczebność analizowanych grup była wystarczająca do przeprowadzenia analiz statystycznych, a użyte w pracy metody statystyczne były dobrane właściwie. Dane opracowano w programie Statistica 13.1 PL.

W rozdziale „Wyniki” (12 stron) Doktorantka analizuje wybrane do oceny parametry, odpowiadając na 4 pytania badawcze postawione w rozdziale „Cel pracy”. W przypadku każdego z trzech analizowanych microRNA zaobserwowano istotne statystycznie różnice w ekspresji w osoczu pacjentów chorujących na astmę względem grupy kontrolnej. W analizie zależności między ciężkością obturacji, a ekspresją badanych microRNA stwierdzono ujemną statystycznie istotną korelację między ekspresją hsa-miR-382 a wartością natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej (FEV₁). Oceniając stopień kontroli astmy i ekspresję badanych microRNA zaobserwowano statystycznie istotną ujemną korelację ekspresji hsa-miR-382 ze stopniem kontroli astmy ocenianym testem ACQ. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w ekspresji hsa-miR-224, hsa-miR-5p i hsa-miR-382 w zależności od dawki stosowanych w leczeniu astmy oskrzelowej sterydów wziewnych. Wyniki swojej pracy przedstawia w 12 tabelach i na 6 wykresach.

W kolejnym rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja” (11 stron) Doktorantka w zwięzły sposób przedstawia dane z literatury na temat roli microRNA w rozwoju chorób nowotworowych, patogenezie i przebiegu astmy oskrzelowej, oraz powstawaniu innych przewlekłych chorób układu oddechowego. Omawia wpływ microRNA na rozwój mechanizmów zapalnych w astmie oskrzelowej, jak również wskazuje na możliwości klinicznego zastosowania microRNA jako markera pozwalającego na wykrycie choroby oraz określenie ciężkości jej przebiegu, a w dalszej perspektywie potencjalne możliwości terapii. Szczegółowo omawia uzyskane wyniki ekspresji poszczególnych microRNA w osoczu pacjentów chorujących na astmę i w grupie kontrolnej oraz ich korelację z ciężkością obturacji, stopniem kontroli astmy oraz wielkością przyjmowanej dawki wziewnych glikokortykosteroidów. Wyniki swoich badań porównuje z danymi uzyskanymi w badaniach przedstawionych w piśmiennictwie i dyskutuje z podobieństwami i różnicami.

Na zakończenie Doktorantka sformułowała 4 wnioski:

1. W astmie dochodzi do wzrostu ekspresji hsa-miR-224, hsa-miR-339-5p oraz hsa-miR-382. Mogą one być związane z rozwojem mechanizmów zapalnych, które prowadzą do rozwoju tej choroby.
2. Wśród pacjentów z astmą stwierdzono ujemną korelację ekspresji hsa-miR-382 ze stopniem obturacji mierzonym FEV₁. Możemy zatem sądzić, że im wyższe miR-382 tym cięższa obturacja.
3. Wśród pacjentów z astmą wykazano ujemną korelację ekspresji hsa-miR-382 ze stopniem kontroli choroby, mierzonym w teście ACQ. Możemy zatem sądzić, że im wyższa ekspresja miR-382 tym gorsza kontrola choroby.
4. Nie wykazano natomiast związku między ekspresją żadnego z trzech badanych microRNA a przyjmowaną dawką glikokortykosteroidów wziewnych. Można wysunąć na tej podstawie wniosek, że ekspresja microRNA nie ma związku z przyjmowanym leczeniem. Potwierdza ten fakt także dostępna literatura.

Wnioski z otrzymanych wyników badań zostały sformułowane właściwie i konkretnie. Są odpowiedzią na założone cele pracy.

Zastosowane piśmiennictwo jest aktualne, zostało prawidłowo dobrane i ujęte w tekście.

Streszczenie w języku polskim i angielskim jest zrozumiałe i zawiera istotę wykonanej pracy.

Podsumowując, chciałabym zwrócić uwagę, iż Doktorantka podjęła się realizacji ciekawego, nośnego aktualnie w literaturze tematu ekspresji jednoniciowych, endogennych, niekodujących RNA, które biorą udział w regulacji szeregu procesów w organizmie. Szczególnie cenne wydaje się użycie osocza jako materiału, z którego izolowano microRNA, jak dotąd zdecydowana większość badań opiera się na materiale z nabłonka dróg oddechowych, popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych czy płwociny. Wybór tematu badań, a także protokół badania i jego realizacja zasługują na uznanie, a sformułowane wnioski dają cenne informacje przydatne w pracy lekarzy klinicystów.

Oceniając bardzo dobrze przygotowaną przez Doktorantkę pracę, muszę podzielić się pewnymi uwagami. W rozdziale „Materiał i metody” Doktorantka nie uzasadnia jasno, dlaczego wybrano do badania akurat te 377 microRNA. Kolejnym zastrzeżeniem jest zdecydowanie zbyt lakoniczne opisanie procedur wykonywania badań w podrozdziale „Badanie wstępne” oraz podrozdziale „Izolacja RNA, RT-PCR”:

- brak nagłówków do wykonywanych procedur,
- jaką krew pobierano i z jakiego miejsca do izolacji RNA?
- z jakiej ilości osocza izolowano RNA i jakie miRNA? czy total RNA?
- czego użyto do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji miRNA i w jakich ilościach?
- jakich starterów używano do preamplifikacji?

Drobne błędy, które wymagają poprawienia przed oddaniem manuskryptu do druku to:

- ujednolicenie we wszystkich miejscach manuskryptu skrótu FEV₁ (zamiast Fev1 lub Vef1 – str. 64), (1 w indeksie dolnym).
- Str. 35 Toll-like receptor zamiast Toll-like recpetor, limfocytów zamiast limfocyty.
- Str. 46 Master Mix zamiast Master Mic, q-PCR, zamiast Q-PCR, uzupełnić zawartość nawiasu w 11 wierszu tekstu.
- Str. 54 RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR) zamiast qRT-PCR
- Str. 79 niedrobnokomórkowego zamiast nie drobnokomórkowgo.

Całość recenzowanej pracy oceniam wysoko, a jej konstrukcja świadczy, że Doktorantka potrafi samodzielnie rozwiązać problem naukowy i wykazuje się dużą wiedzą.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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.)

Wobec powyższego, przedstawiam Wysokiej Radzie Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie lek. med. Małgorzaty Aurelii Pietrusińskiej-Miedzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. n. med. Barbara Mackiewicz

