UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
Zakład Genetyki Klinicznej
ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin
tel./fax. 81 448 61 10; E-mail: janusz.kocki@umlub.pl
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki

Lublin, dnia 12. 10. 2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „MikroRNA jako potencjalny marker tętniaków aorty brzusznej"

lek. Sabiny Lichołai

z Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

W odpowiedzi na prośbę Pana prof. dr hab. Rafała Olszaneckiego, Przewodniczącego *Rady Dyscypliny Nauki medyczne UJ Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie*, przedstawiam recenzję rozprawy doktorskiej lek. Sabiny Lichołai, ubiegającej się o stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotora prof. dr hab. n. med. Marka Sanaka, kierownika Zakładu Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Praca została sfinansowana ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki: *Diamentowy Grant* No 0062/DIA/2013/42 oraz NCN: *Preludium* No 2016/21/N/NZ2/01735.

Rozprawę doktorską stanowi monotematyczny cykl dwóch publikacji opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych z listy *JCR*:

Publikacja 1: *Lichołai, S.; Studzińska, D.; Plutecka, H.; Gubała, T.; Szczeklik,W.; Sanak, M. MiR-191 as a Key Molecule in Aneurysmal Aortic Remodeling. Biomolecules* ***2021****, 11, 1611. https://doi.org/10.3390/biom11111611*. Indywidualny wkład Doktorantki polegał na opracowaniu koncepcji projektu i uzyskania grantu badawczego, przygotowaniu dedykowanych skryptów obliczeniowych, wykonywaniu oznaczeń eksperymentalnych i analizie danych, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu. Powyższy wkład Doktorantki został potwierdzony pisemnie przez współautorów. IF=5,92; 140 punktów MEiN.

Publikacja 2: *Lichołai, S.; Studzińska, D.; Plutecka, H.; Gubała, T.; Sanak, M. Comprehensive Analysis of Circular RNAs in Endothelial Cells. Int. J. Mol. Sci.* ***2023****, 24, 10025. https://doi.org/10.3390/ijms241210025*. Indywidualny wkład Doktorantki polegał na opracowaniu koncepcji projektu i uzyskania grantu badawczego, przygotowaniu dedykowanych skryptów obliczeniowych, wykonywaniu oznaczeń eksperymentalnych i analizie danych, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu. Powyższy wkład Doktorantki

został potwierdzony pisemnie przez współautorów, oprócz Promotora rozprawy – w czasie obrony proszę o przedstawienie stosowanej zgody Promotora na wykorzystanie tej publikacji jako części niniejszej rozprawy doktorskiej. IF=5,6; 140 punktów MEiN.

W obu publikacjach cyklu Doktorantka jest pierwszym autorem. Łączny IF ww. dwóch publikacji to 10,52 (280 punktów MEiN). Cykl publikacji spełnia rekomendacje *Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie* obowiązujące w postepowaniu o nadanie stopnia doktora.

Rozprawa doktorska jest napisana poprawnie w języku polskim i jest przedstawiona w formie wydruku komputerowego. Rozprawa liczy 84 strony, jest podzielona na następujące rozdziały - typowe dla tego rodzaju opracowań: *Streszczenie w języku polskim* str. 5-6, *Streszczenie w języku angielskim* str. 7-8, *Wstęp i teoretyczne podstawy pracy* str. 9-15, *Spis publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej* str. 16. *Cele pracy* str. 17-18, *Metody i organizacja badań* str. 19-23, *Wyniki badań i podsumowanie* str. 24-41, *Wnioski* str. 42-43, *Skróty* str. 44, *Piśmiennictwo* str. 45-49, *Publikacje składające się na pracę doktorską* str. 50-75, *Oświadczenia współautorów* str. 76-84.

Wysoko oceniam wybór tematu rozprawy doktorskiej. Podjęty temat rozprawy doktorskiej jest bardzo ważny klinicznie. Pierwsze prace dotyczące udziału mikroRNA w patogenezie tętniaków aorty pochodzą z lat 2010-2011. Tętniaki mogą mieć podłoże zwyrodnieniowe, niektóre są związane z chorobami tkanki łącznej lub predyspozycjami genetycznymi. Tętniaki aorty, zarówno w odcinku aorty brzusznej, jak i piersiowej, mają patogenezę nie do końca poznaną. Krążące mikroRNA mogą wpływać na komórki śródbłonka naczyń i regulować homeostazę, angiogenezę, aktywność płytek krwi czy adhezję leukocytów. W ostatnich latach obserwujemy znaczny wzrost badań nad patogenezą tętniaków aorty, co zaowocowało odkryciem nowych mechanizmów i wdrożeniem badań klinicznych w tym obszarze. Pomimo tych działań, nadal istnieje wiele pytań bez odpowiedzi i sprzecznych ustaleń wymagających wyjaśnienia.

Wstęp stanowi zbiór współczesnych informacji na temat czynników ryzyka wystąpienia tętniaków aorty brzusznej, udziału czynników epigenetycznych w tym mikroRNA oraz zjawiska sekwestracji mikroRNA.

W tym kontekście, na podkreślenie zasługują ważne klinicznie wyznaczone cele rozprawy doktorskiej, obejmujące zaplanowane badania przedstawione w rozdziale *Cele pracy.* W rozdziale tym Autorka przedstawiła hipotezy badawcze oraz cele poszczególnych publikacji z cyklu (str. 17-18).

Doktorantka w pierwszym etapie przeprowadziła badanie pilotażowe u 10 chorych z tętniakiem aorty brzusznej oraz 10 dobranych zdrowych ochotników w celu wyboru najbardziej prawdopodobnych mikroRNA, biorących udział w patogenezie tętniaków aorty. Były to cząsteczki: miR-191, miR126 i miR-21-5p, które oceniono funkcjonalnie w komórkach endotelialnych.

Badania przeprowadzono w grupie 205 pacjentów z tętniaków aorty brzusznej oraz w grupie 180 pacjentów z wykluczonym tętniakiem aorty. Należy podkreślić bardzo dobry dobór pacjentów z obu grup: badanej i kontrolnej, co przedstawiono w tabeli 1 na str. 25. Badania uzyskały zgodę stosownych dwóch komisji bioetycznych. W badaniach wykorzystano próbki surowicy z lokalnego biobanku. Wyizolowano RNA, wykonano syntezę

cDNA oraz analizę ekspresji metodą PCR w czasie rzeczywistym, wykorzystując komercyjne sondy. W celu analizy funkcjonalnej w modelu *in vitro* przeprowadzono transfekcję komórek *iCell Endothelail Cells*.

Należy podkreślić dbałość o odpowiednie standardy metodyczne, np. wykorzystanie próbek RNA wysokiej jakości (RIN>9). Technikę sekwencjonowania przeprowadzono w systemie *2500 HiSeq* firmy *Illumina* z analizą bioinformatyczną, m. in. wykorzystano oprogramowanie *DESeq2* w środowisku *R*. Następnie odtworzono profil cyrkularnego RNA w komórkach śródbłonka poddanych nadekspresji wybranymi mikroRNA.

Wykonane badania umożliwiły oznaczenie poziomu wybranych mikroRNA w surowicy chorych z tętniakiem aorty, określenie wpływu wybranych mikroRNA na transkryptom komórek śródbłonka oraz wyznaczenie profilu cyrkularnych RNA, zaproponowanych jako cząsteczki markerowe dla tętniaka.

Poniżej przedstawiam najważniejsze osiągnięcia poszczególnych publikacji stanowiących zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Publikacja 1. Celem pracy była ocena poziomu krążącego miR-191 w grupie pacjentów z tętniakiem aorty brzusznej w porównaniu z grupą kontrolną. Wybrano model komórkowy *in vitro* w celu oceny wpływu miR-191 na transkryptom i oceniono jego zależności funkcjonalne.

Zaobserwowano istotne zmiany w ekspresji 1492 genów kodujących białka. Przedstawiono również listę 50 genów o najwyższej zmienności poziomów ekspresji – wzrostu lub obniżenia. Następnie dokonano analizy funkcjonalnej w celu identyfikacji biologicznych procesów potencjalnie modulowanych przez miR-191 i potwierdzono co najmniej 27 szlaków funkcjonalnych. Były to m. in. szlaki związane z adhezją komórkową, wiązaniem metali przez metalotioneiny, aktywacją układu immunologicznego, metylacji DNA oraz sygnalizacji interleukinowej. Procesy te były już wcześniej opisywane w patogenezie tętniaków aorty brzusznej ale w tej publikacji powiązano je z udziałem miR-191 w komórkach śródbłonka.

Wyciągnięto krytyczne wnioski: nie można udowodnić, że miR-191 jest przyczyną tętniaków aorty ale można go uznać za cząsteczkę towarzysząca w rozwijającej się patologii – przez co miR-191 mógłby być w przyszłości wykorzystany jako biomarker choroby.

Należy podkreślić wykorzystanie unikalnego modelu *in vitro*, w którym przy użyciu komórek z fenotypem śródbłonka, określono wpływ miR-191 na transkryptom.

Publikacja 2. W publikacji scharakteryzowano cyrkularne RNA w komórkach śródbłonka naczyń i dynamikę zmian pod wpływem wybranych cząsteczek mikroRNA. W pracy wykorzystano unikalny model komórkowy: *iCell Endothelial Cells* (Cellular Dynamics), pochodzący z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (*iPS cells*).

Zastosowano technikę sekwencjonowania następnej generacji i zidentyfikowano pulę 1068 kolistych RNA obecnych w śródbłonku, z których 13 nie było wcześniej zgłoszonych do stosownych baz danych. W pracy wykonano interesującą analizę poziomu ekspresji zidentyfikowanych cyrkularnych RNA w zależności od ich lokalizacji genomowej. Dla każdego chromosomu wyznaczono liczbę genów kodujących białka i liczbę unikalnych sekwencji circRNA.

Następnie zbadano zależność między długością dojrzałego produktu mRNA a liczbą odczytów dla poszczególnych circRNA. Stwierdzono, że w przypadku 587genów powstaje tylko jeden indywidualny typ cząsteczki circRNA; dla 126 genów powstają dwa cyrkularne transkrypty alternatywne a dla 2 genów opisano 8 różnych circRNA. Postawiono hipotezę, ze w przeciwieństwie do liniowych form mRNA ze zmiennym poziomem ekspresji w wyniku różnych mechanizmów regulacji zmiany poziomu ekspresji cyrkularnego RNA mogą być przypadkowe.

Dla czterech genów (*RAPGEF5, RICTOR, PKN1, GTDC1*) otrzymane circRNA wykazały statystycznie znacząco zmienioną ekspresję w każdym z wariantów transfekcji przez mikroRNA, pomimo braku specyficznych miejsc docelowych.

Wykazano, że największy potencjał do nadekspresji cyrkularnych RNA to cząsteczki, w których stosunek długości sekwencji genu macierzystego do liczby jego eksonów jest niższa niż średnia dla całego genomu. Sugeruje to, że tworzenie cyrkularnych RNA jest łatwiejsze dla genów z większą liczbą eksonów.

Na podkreślenie zasługuje doskonała dokumentacja graficzna przedstawiająca uzyskane wyniki badań.

Przedstawiona dyskusja wyników badań w kontekście doniesień literaturowych jest również wysokim osiągnięciem Doktorantki.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorantka na str. 42-43 przedstawiła interesujące wnioski, opracowanych na podstawie uzyskanych wyników w cyklu publikacji – uważam, że są ważnym głosem w dyskusji na temat udziału mikroRNA w patogenezie tętniaków aorty brzusznej.

Stwierdzam, że wszystkie założenia badań zostały w pełni wykonane.

Doktorantka przedstawiła spis wykorzystanych pozycji piśmiennictwa, które są dobrze dobrane w kontekście tematyki pracy.

W podsumowaniu podkreślam, że Doktorantka zrealizowała badania zgodnie z wytyczonymi celami, z zastosowaniem właściwych metod badawczych a uzyskane wyniki poprawnie zinterpretowała na podstawie wykonanych analiz i danych literaturowych.

Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędów językowych i stylistycznych: np. wers 9 od góry str. 14 – brak końca zdania; w tabeli 3 str. 28 przy opisie istotności statystycznej „p" powinny być wartości 0,0001 w miejsce 0,000. Przedstawione powyżej moje uwagi, jako recenzenta, nie zmniejszają w żaden sposób wartości pracy

Przedstawione przez Doktorantkę wyniki badań są znaczącym wkładem w rozwój reprezentowanej dyscypliny naukowej. Jest zrozumiałe, że wykonanie badań interdyscyplinarnych przedstawionych w dwóch publikacjach, wymagało pracy w zespole i udziału wielu osób, co podkreśla dojrzałość naukową Doktorantki.

Rozprawa jest znaczącym osiągnięciem Doktorantki i spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w stosownej *Ustawie* (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z poźn. zm.). Została przygotowywana pod opieką promotora i stanowi oryginalne rozwiązanie przez Autorkę problemu naukowego. Doktorantka wykazał dużą, ogólną wiedzę teoretyczną w określonej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, staranność i dbałość w przygotowaniu manuskryptu rozprawy oraz potencjalne znaczenie dla przyszłych praktycznych aplikacji klinicznych, rozprawę oceniam pozytywnie i bardzo wysoko, stawiając wniosek do *Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie* o dopuszczenie lek. Sabiny Lichołai do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Stwierdzam, że projekt rozprawy doktorskiej został właściwie zaplanowany a właściwy dobór metod badawczych pozwolił na właściwą realizację założeń pracy. Świadczy też o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia badań naukowych na odpowiednio wysokim poziomie.

W mojej opinii, cykl publikacji spełnia również rekomendacje *Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie* obowiązujące w postepowaniu o nadanie stopnia doktora w obszarze wyróżnień. Biorąc pod uwagę powyższe podsumowanie, zgłaszam również wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. Sabiny Lichołai.

Prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki