

OCENA

rozprawy doktorskiej lek. Pamelii Czajki pt. „Określenie znaczenia rokowniczego nowych mikroRNA związanych z płytkami krwi u pacjentów z udarem niedokrwiennym” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Dagmary Mirowskiej-Guzel oraz promotora pomocniczego dr n. med. Ceren Eyileten-Postuły z Katedry i Zakładu Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

W ostatnich latach pojawiają się coraz liczniejsze obserwacje, które sugerują kluczową rolę mikroRNA (miRNA) w patogenezie i progresji wielu chorób, w tym chorób układu sercowo-naczyniowego. miRNA stanowią małe endogenne cząsteczki RNA, składające się z około 22 nukleotydów, które biorą udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Każde miRNA może wpływać na ekspresję kilku różnych genów docelowych, regulując w ten sposób kluczowe procesy fizjologiczne/patofizjologiczne, takie jak różnicowanie komórkowe, proliferacja, homeostaza, apoptoza. Dlatego nie jest zaskakującym, że deregulacja funkcji miRNA może prowadzić do rozwoju wielu patologii. Wykorzystanie tkankowej ekspresji miRNA w procesie diagnostycznym posiada jednakże liczne ograniczenia związane głównie z dostępnością materiału do badań. Stąd też poszukuje się zależności pomiędzy krążącymi miRNA w płynach ustrojowych, np. w osoczu, moczu, które mogłyby być uważane za potencjalne biomarkery. miRNA występują w płynach ustrojowych, w tym w osoczu, na stosunkowo stabilnym poziomie, a zatem mogą potencjalnie odróżniać pacjentów od osób zdrowych. Chociaż krążące miRNA jako potencjalnie nieinwazyjne biomarkery definiuje się dopiero od niedawna, wiele badań sugeruje ich potencjał diagnostyczno-prognostyczny w różnych stanach patologicznych, m. in. nowotworach, chorobach zakaźnych (HBV, HCV), chorobach sercowo-naczyniowych (niewydolność serca, zawał mięśnia sercowego, zaburzenia rytmu serca, nadciśnienie płucne). Wyniki ostatnio opublikowanej metaanalizy (Deng Y, Huang P, Zhang F, Chen T. Association of MicroRNAs With Risk of Stroke: A Meta-Analysis. *Front Neurol.* 2022 May 19;13:865265) wykazały związek między odmiennym profilem osoczowego miRNA a ryzykiem wystąpienia udaru niedokrwiennego. W powyższej meta-analizie wskazano na parametr składający się z trzech miRNA (miR-1268b, miR-4433b-3p, miR-6803-5p) jako charakteryzujący się najwyższą czułością (0,99, 95% CI 0,93–1) i przydatnością diagnostyczną (229,43, 95% CI 29,16–1805,41), co sugeruje potencjalną rolę ww. modelu kombinacji 3-miRNA jako biomarkera udaru niedokrwiennego. Powyższe obserwacje wskazują na potencjalną przydatność diagnostyczno-prognostyczną i konieczność dalszych badań walidujących miRNA jako biomarkerów, również udaru niedokrwiennego. Ponadto, badania przedkliniczne jak i kliniczne dostarczają dowodów, że modulowanie poziomów swoistych miRNA

pochodzących z pęcherzyków pozakomórkowych wytwarzanych endogennie przez wiele komórek i narządów, zwłaszcza przez mezenchymalne komórki macierzyste może przyczynić się do opracowania nowych metod terapii udaru niedokrwinnego.

Przedłożona do oceny praca posiada typowy układ dla tego typu opracowań, zawiera wstęp, określenie celów pracy, opis materiału i metod, przedstawienie wyników, dyskusję oraz wnioski, jak również streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz bibliografii, spis tabel i rycin. Piśmiennictwo jest adekwatnie dobrane i cytowane.

We wstępie stanowiącym najobszerniejszy rozdział rozprawy doktorskiej, podzielonym na podrozdziały, Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący udaru niedokrwinnego, w tym epidemiologię, patofizjologię oraz postępowanie kliniczne, ze szczególnym uwzględnieniem roli miRNA w oparciu o wyniki badań przedklinicznych oraz klinicznych. Wstęp zawiera informacje na temat miRNA związanych z mikropecherzykami pochodzącymi z mikrogleju, miRNA pęcherzyków pozakomórkowych pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego oraz tkanki nerwowej w udarze niedokrwinnym. Odrębny podrozdział poświęcono aktywacji płytek krwi w patofizjologii udaru niedokrwinnego i roli miRNA jako regulatorów fizjologicznej reaktywności płytek krwi. Wstęp stanowi więc bardzo dobre uzasadnienie do podjęcia badań poszerzających wiedzę dotyczącą roli miRNA w patofizjologii udaru niedokrwinnego, zwłaszcza w odniesieniu do potencjału agregacyjnego płytek krwi.

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie Doktorantka sformułowała następujące cele pracy doktorskiej w oparciu o ekspresję wybranych, krążących we krwi pełnej miRNA w ostrej fazie udaru niedokrwinnego pod kątem przydatności diagnostycznej i prognostycznej, tj.: 1) ustalenie czy ekspresja wybranych miRNA określonych uprzednio w badaniach *in silico* jako związane z udarem niedokrwinnym oraz funkcją płytek krwi lub procesami krzepnięcia (miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-15a-5p, let-7e oraz miR-125a-3p i -5p) jest zmieniona u chorych w ostrej fazie udaru niedokrwinnego w porównaniu z populacją bez udaru; 2) ocena ekspresji miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-15a-5p, let-7e oraz miR-125a-3p i -5p pod kątem przydatności klinicznej jako biomarkery diagnostyczne udaru niedokrwinnego; 3) analiza ekspresji miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-15a-5p, let-7e oraz miR-125a-3p i -5p pod kątem przydatności prognostycznej w krótkoterminowej, 7-dniowej obserwacji. Należy zauważyć, że powyżej przedstawione cele badania zostały sformułowane w oparciu o wyniki dotychczasowej aktywności naukowej Doktorantki, głównie analizy bioinformatycznej miRNA. Na uwagę zasługuje również fakt pozyskania funduszy zewnętrznych na realizację badań, których wyniki zawiera niniejsza rozprawa doktorska, tj. projekt "Time 2 MUW doskonałość dydaktyczna szansą rozwoju Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego." współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój na lata 2014 – 2020, numer umowy o dofinansowanie: POWR.03.05.00-00-Z040/18-00.

Dla zrealizowania postawionych celów Doktorantka włączyła do badań 60 chorych z ustalonym rozpoznaniem ostrego udaru niedokrwinnego mózgu na podstawie objawów klinicznych zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia oraz badań obrazowych mózgu (TK lub MRI), tj. pacjentów z udarem niedokrwinnym spowodowanym miażdżycą dużych naczyń oraz podgrupę pacjentów z udarem niedokrwinnym o nieznanym etiologii z co najmniej 50% zwężeniem tętnicy szyjnej zlokalizowanej po tej samej stronie w stosunku do strony zawału z ujemnym wywiadem dotyczącym migotania przedsionków. Grupę kontrolną stanowiło 30 dobranych pod względem wieku i płci pacjentów wolnych od udaru mózgu z licznymi czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej lub obecną chorobą wieńcową. Charakterystyka grupy kontrolnej powinna zawierać obiektywne kryteria szacowania ryzyka choroby sercowo-naczyniowej, np. ocena wg przyjętych kalkulatorów ryzyka (skala SCORE (ang. *Systematic Coronary Risk Evaluation*)). Od uczestników badania pobierano krew obwodową (dwukrotnie: w ciągu 24 godzin od początku objawów udaru niedokrwinnego oraz w 7. dobie hospitalizacji), z której izolowano miRNA. W oparciu o uprzednio przeprowadzoną analizę bioinformatyczną (Wicik Z, Czajka P, Eyileten C, et al. The role of miRNAs in regulation of platelet activity and related diseases - a bioinformatics analysis. *Platelets*. 2022;33: 1052–1064) oraz dane literaturowe, w ramach niniejszej pracy oznaczano ekspresję następujących miRNA: Let-7e, miR-125a-3p i -5p, miR-106b-5p, miR-16-5p oraz miR-15a-5 przy użyciu zestawu komercyjnie dostępnych, dedykowanych sond molekularnych TaqMan miRNA Assay. Uzupełnienia wymagają dane dotyczące analizy mocy testu i oceny liczebności grup. Pewnym ograniczeniem, co zauważa sama Doktorantka, jest również brak możliwości analizy prób w pierwszych godzinach po wystąpieniu udaru (a tym samym określania dynamiki zmian ekspresji miRNA w tym okresie). W podsumowaniu należy jednakże stwierdzić, że sposób zaplanowania badań świadczy o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktorantki.

Po przeprowadzeniu pomiarów ekspresji miRNA w badanych grupach pacjentów Doktorantka wykazała m.in., że niższy poziom ekspresji miR-125a-3p u pacjentów z udarem zarówno przy przyjęciu do szpitala jak i 7. dobie po udarze (w porównaniu z osobami zdrowymi, odpowiednio $p=0,008$, $p=0,020$); wyższą ekspresję miR-125a-5p u chorych z udarem przy przyjęciu w porównaniu z grupą kontrolną, która uległa istotnemu obniżeniu w czasie hospitalizacji (odpowiednio $p=0,002$, $p=0,016$); istotnie wyższą ekspresję Let-7e u osób zdrowych w porównaniu z pacjentami z udarem mózgu, zarówno w dniu przyjęcia do szpitala jak i w dniu 7. (odpowiednio $p=0,007$, $p<0,001$); możliwą wartość diagnostyczną miR-125a-3p i miR-125a-5p określaną AUC ROC [miR-125a-3p 0,705 (95% CI, 0,57-0,84) $p=0,008$; miR-125a-5p 0,709 (95% CI, 0,58-0,84) $p=0,002$]; istotnie podwyższony poziom ekspresji miR-16-5p u pacjentów z umiarkowanym udarem w porównaniu z pacjentami z udarem łagodnym w dniu wystąpienia ostrego udaru niedokrwinnego (AUC ROC 0,718, (95% CI, 0,59-0,85) $p=0,004$); istotną korelację miR-16-5p z ciężkością udaru niedokrwinnego (wartość odcięcia $\leq 10,6$ dla niskiej ekspresji miR-16-5p; czułość 68% i swoistość

65%); wysoka wyjściowa ekspresja miR-16-5p wraz z cukrzycą są niezależnymi predyktorami zwiększonej ciężkości udaru (odpowiednio OR: 4,34; 95% CI, 1,15-16,42; $p = 0,031$ i OR: 4,65; 95% CI, 1,07-20,19; $p = 0,040$), według wieloczynnikowego modelu regresji logistycznej. W rozprawie doktorskiej powinny zostać również umieszczone wyniki, które nie wykazywały istotności statystycznej. Ich przedstawienie stanowi o pełnej dokumentacji badania, a wyniki mogłyby być poddane analizie nie tylko przez recenzentów ale również i innych badaczy w przyszłości. W rozdziale wyniki nie przedstawiono również danych z podgrupy opisywanej w rozdziale 6.1 Materiał i Metody, tj. podgrupa pacjentów z udarem niedokrwiennym o nieznannej etiologii z co najmniej 50% zwężeniem tętnicy szyjnej zlokalizowanej po tej samej stronie w stosunku do strony zawału z ujemnym wywiadem dotyczącym migotania przedsionków. Uzyskane dane być może można by poddać analizie pod kątem panelu miRNA (kilka miRNA) jako potencjalnych markerów diagnostycznych i prognostycznych udaru niedokrwiennego.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła trzy wnioski: 1. Zgodnie z hipotezą badawczą wysnutą na podstawie przeprowadzonych wcześniej analiz *in silico* u pacjentów w ostrej fazie udaru niedokrwiennego zaobserwowano różnice w ekspresji miR-16-5p, let-7e, miR-106b-5p, miR-125a-3p i 5p w porównaniu z populacją bez udaru. Wskazuje to na ich związek z patofizjologią udaru niedokrwiennego; 2. Spośród badanych miRNA różnica ekspresji miR-125a-3p i miR-125a-5p była istotna statystycznie, ale obecnie nie jest możliwe określenie czy mogą być one biomarkerami diagnostycznymi z uwagi na brak obserwacji dynamiki ekspresji w ciągu pierwszych kilku godzin od wystąpienia epizodu niedokrwiennego; 3. Ekspresja miR-16-5p wykazała istotną korelację z ciężkością udaru niedokrwiennego w krótkoterminowej obserwacji, co wskazuje na jego szczególną wartość prognostyczną, której weryfikacja powinna nastąpić w kolejnych, odpowiednich liczebnie i długoterminowych obserwacjach. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski dobrze oddają uzyskane wyniki, wynikają bezpośrednio z analizy wyników uzyskanych w czasie realizacji badań.

Dyskusja przeprowadzona przez Autorkę jest prowadzona bardzo dojrzałe. Doktorantka umiejętnie odniosła własne wyniki do dostępnych danych literaturowych. Sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza bardzo dobre przygotowanie metodyczne i szeroką wiedzę dotyczącą tematyki prowadzonych badań. W dyskusji Autorka wskazuje na możliwe zastosowanie oznaczania miRNA jako potencjalnych markerów diagnostycznych i prognostycznych udaru niedokrwiennego oraz analizuje, w oparciu o aktualny stan wiedzy, możliwe patofizjologiczne implikacje miRNA, których ekspresja różnicowała chorych z udarem i grupy kontrolnej w niniejszym opracowaniu.

W obszernej opracowaniu Doktorantka nie ustrzegła się niewielkich uchybień, np. zaliczając do chorób układu krążenia cukrzycę typu 2 („Do chorób układu krążenia zaliczono chorobę wieńcową, zawał serca w wywiadzie oraz cukrzycę typu 2”, która jest czynnikiem ryzyka wystąpienia chorób układu krążenia;

używając terminu trójglicerydy wobec aktualnie obowiązującego triacyloglicerole; w tabeli 2 nie umieszczono jednostek przedstawionych parametrów; w tabeli 4 niektóre dziesiętne oznaczono jako (.) zamiast (,).

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autorki, która dobrze opanowała niełatwy warsztat badawczy i wykazała dobre merytoryczne przygotowanie. Uważam, że praca stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)". Dlatego też zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Pamelii Czajki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik