



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

dr hab. Marcin Ruciński prof. UM.

Collegium Anatomicum, ul. H. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

tel.: +48 690 938 038, e-mail: marcinruc@ump.edu.pl

---

Poznań 10.01.19

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Beaty Narożnej pt. „Analiza roli ekspresji mikroRNA w procesie naprawy uszkodzonego nabłonka oddechowego na modelu *in vitro*”

Nabłonek dróg oddechowych jest złożonym nabłonkiem wielorzędowym, który stanowi barierę ochronną przed szkodliwymi czynnikami środowiska zewnętrznego. Jest on szczególnie narażony na działanie patogennych mikroorganizmów oraz alergenów. W jego obrębie występują między innymi komórki endokryne, które poprzez sekrecję hormonów peptydowych oraz amin biogennych, pełnią kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowej homeostazy dróg oddechowych. Nabłonek dróg oddechowych posiada także niewielkie komórki podstawne, stanowiące rezerwuar komórek macierzystych, aktywowanych między innymi w procesach uszkodzenia oraz naprawy. Powszechnie wiadomo, że naprawa nabłonka jest zależna od ekspresji specyficznych genów, a jednym z kluczowych mechanizmów regulacji ich ekspresji jest interakcja niewielkich niekodujących cząsteczek RNA (miRNA) z regionami UTR genów docelowych. Współcześnie wykorzystywane metody transkryptomyczne takie jak NGS mikromacierze lub qPCR wysokiej gęstości umożliwiają szybką identyfikację wszystkich miRNA oraz ich genów docelowych ulegających ekspresji w badanym materiale biologicznym. Badania te dają całościowy wgląd w procesy regulacji ekspresji genów jak i również przyczyniają się do określenia patomechanizmów wielu jednostek chorobowych. Identyfikacja miRNA

oraz genów docelowych uczestniczących w procesach naprawy uszkodzeń nabłonka dróg oddechowych może przyczynić się do opracowania nowych strategii terapeutycznych oraz metod diagnostycznych chorób układu oddechowego. W tym kontekście rozprawa mgr Beaty Narożnej wpisuje się w nurt aktualnych i niezwykle istotnych badań.

Trzon przedstawionej do recenzji pracy stanowi cykl trzech publikacji o wysokich wartościach wskaźnika IF oraz punktacji MNiSW. Publikacje składające się na rozprawę doktorską zostały wcześniej pozytywnie ocenione przez redakcje czasopism oraz niezależnych recenzentów, co świadczy o tym, że badania zostały prawidłowo zaplanowane, przeprowadzone oraz zinterpretowane przez Doktorantkę. Publikacje te zostały wydane w latach 2017 – 2018. Prace z 2017 roku cieszą się zainteresowaniem innych badaczy. Według bazy Google Scholar, każda z nich była już dwukrotnie cytowana. W dwóch pracach doktorantka pełni rolę pierwszego autora a w jednej pracy zajmując drugą pozycję, co świadczy o jej istotnym wkładzie w powstanie powyższych publikacji. Fakt ten został również potwierdzony przez współautorów w stosownych oświadczeniach zamieszczonych w końcowej części doktoratu. Przedstawione publikacje stanowią spójny jednotematyczny cykl badań, których głównym celem była ocena wpływu miRNA na naprawę uszkodzonego nabłonka dróg oddechowych *in vitro* poprzez zbadanie profilu ekspresji miRNA w czasie naprawy uszkodzenia, weryfikację funkcjonalną udziału wybranych miRNA w tym procesie oraz poszukiwanie genów docelowych regulowanych przez miRNA. Układ przedstawionej do oceny rozprawy różni się znacznie od klasycznych opracowań dysertacji doktorskich, jednakże różnica ta wynika ze specyficznej formy rozprawy na podstawie cyklu publikacji. W związku z czym sama rozprawa nie jest obszerna i obejmuje łącznie 53 strony maszynopisu. Składa się ona ze słów kluczowych, oświadczeniu o finansowaniu, wykazu publikacji stanowiących cykl, wykazu stosowanych skrótów, omówienia cyklu publikacji wraz z najważniejszymi wnioskami, streszczenia w języku polskim oraz angielskim, kopii publikacji oraz oświadczeń współautorów.

Rozdział zatytułowany „Omówienie cyklu publikacji” rozpoczyna się od przedstawienia problemu badawczego. Autorka pokrótce opisuje rolę nabłonka dróg oddechowych skupiając się głównie na procesie regeneracji oraz naprawy. Na

podstawie własnych doświadczeń jak i danych literaturowych słusznie zakłada, iż miRNA mogą pełnić istotną rolę regulacji wyżej wymienionych procesów. Wstęp stanowi uzasadnienie dla przedstawionego celu badawczego rozprawy. Mam tylko jedno zastrzeżenie do tej części pracy. Według wiedzy recenzenta nabłonkiem oddechowym nazywamy nabłonek wyścielający pęcherzyki płucne, który zbudowany jest ze specyficznych komórek uczestniczących w wymianie gazowej – penumocytów. W dysertacji doktorantka używa terminu „nabłonek oddechowy” opisując w rzeczywistości nabłonek dróg oddechowych, który występuje w odcinkach doprowadzających powietrze. Z treści pracy wynika, że właśnie ten nabłonek był podmiotem prowadzonych prac badawczych.

W pierwszej pracy sprawdzono jaki wpływ wywiera globalne wyciszenie ekspresji miRNA na regenerację nabłonka dróg oddechowych. W tym celu wykorzystano możliwość obniżenia ekspresji dwóch kluczowych genów odpowiedzialnych za ogólną biosyntezę miRNA, jakimi są DROSHA oraz DICER. Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem ludzkiej linii komórkowej nabłonka dróg oddechowych - 16HBE14o. Dodatkowo, bazując na wcześniej wykonanym profilowaniu miRNA, wykonano doświadczenia polegające na zahamowaniu ekspresji pięciu wcześniej wyselekcjonowanych miRNA. Najważniejszym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest to, że inhibicja ekspresji miRNA w skali globalnej ma istotny wpływ na stopień regeneracji badanych komórek, a inhibicja miR-328 spowalnia proces naprawy. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na sześciu wykresach. Należy podkreślić, że wyniki przedstawiono w sposób czytelny wraz z zaznaczeniem wartości statystycznie istotnych. W pracy zawarto także zdjęcia pokazujące tempo regeneracji nabłonka po wykonaniu zadrapania powierzchni wcześniej porośniętej przez badane komórki. Wykorzystując zaawansowane metody bioinformatyczne określono potencjalne geny regulowane przez miR-328 oraz wykazano jakie funkcje fizjologiczne mogą być w ten sposób regulowane.

Kolejna praca cyklu polegała na określeniu roli miRNA w regeneracji hodowli pierwotnej nabłonka dróg oddechowych (NHBE). Ekspresję profilu miRNA oznaczono za pomocą gotowych kart mikrofluidycznych TaqMan Array Human MicroRNA. Celem identyfikacji wspólnego profilu ekspresji miRNA, wykonano analizę klasteryzacji za

pomocą algorytmu STEM. Następnie za pomocą algorytmu miRNA Body Map wytypowano listę potencjalnych genów docelowych, oraz przeprowadzono analizę wzbogaconych szlaków sygnałowych i genów z wykorzystaniem bazy danych DAVID. Ekspresję genów będących potencjalnym celem dla wybranego miRNA oznaczano za metody qPCR. Wykazano, iż najbardziej różnicującym miRNA był miR-455-3p, który jest odpowiedzialny między innymi za regulację ekspresji genów rodziny TGF beta. Drobne zastrzeżenie dotyczy ryciny 5, gdzie w publikacji zamieszczono prawdopodobnie błędny opis ryciny oraz przedstawiono tylko wartość istotności statystycznej analizy ANOVA bez wskazania różnic wynikających z testu post-hoc.

Badania przeprowadzone w ramach trzeciej publikacji polegały na porównaniu profilu ekspresji oraz tempa regeneracji obu wcześniej badanych linii komórkowych. Porównanie ekspresji miRNA w niezróżnicowanych oraz zróżnicowanych hodowlach komórkowych wykazały, że 10 genów miRNA charakteryzuje się podobnym wzorem ekspresji w obu liniach. Kolejne analizy bioinformatyczne wykazały, że miRNA mogą potencjalnie wpływać na geny związane z regulacją cytoszkieletu aktynowego, adhezją, połączeniami międzykomórkowymi.

Podsumowując, poddany recenzji cykl prac, będących podstawą rozprawy doktorskiej mgr Beaty Narożnej pt. „Analiza roli ekspresji mikroRNA w procesie naprawy uszkodzonego nabłonka oddechowego na modelu *in vitro*” oceniam bardzo wysoko. Doktorantka w pełni opanowała umiejętności formułowania problemów badawczych. We wszystkich artykułach punktem wyjścia był aktualny stan wiedzy. Dyskusja w każdym z artykułów jest przemyślana i wskazuje na dogłębną analizę uzyskanych wyników. W publikacjach wykorzystano najnowocześniejsze narzędzia badawcze biologii molekularnej oraz bioinformatyki. Należy podkreślić, że zaprezentowane podejście metodyczne oraz rozwiązania są oryginalne i stanowią istotny wkład w określenie roli miRNA w procesie regeneracji nabłonka dróg oddechowych.

Nie mam wątpliwości, że przedstawiona do oceny dysertacja spełnia ustawowe wymogi 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.). Uważam również, że Doktorantka osiągnęła stopień dojrzałości naukowej uprawniający ją o ubieganie się o stopień doktora i w związku z tym wnoszę do

Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Beaty Narożnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną rozprawy opartej na załączonych publikacjach wnioskuję o jej wyróżnienie.

Marcin Ruciński

