

dr hab. n. med. Dariusz Dobrowolski

Katowice, dnia 16 czerwca 2022r.

Katedra i Oddział Kliniczny Okulistyki,

Wydział Nauk Medycznych w Zabrze,

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

ul. Panewnicka 65, 40-760 Katowice

Kierownik Oddziału Okulistycznego z Zesp. Zabiegowym

Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego nr 5

im. Św. Barbary, Centrum Urazowego w Sosnowcu

Pl. Medyków 1, 41-200 Sosnowiec

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Agnieszki Rafalskiej

p.t. „Zmiany ekspresji mikroRNA w cieple szklistym

w proliferacyjnych chorobach siatkówki”

Witreoretinopatia proliferacyjna (PVR) to konsekwencja zaburzenia metabolizmu siatkówki lub szerzej pogranicza szklistkowo-siatkówkowego, która istotnie wpływa na leczenie chorób siatkówki. W klinicznej praktyce okulistycznej PVR stanowi duże wyzwanie w leczeniu dwóch schorzeń, jedno to odwarstwienie siatkówki, a drugie to retinopatia cukrzycowa. W przypadku cukrzycy PVR to jeden z elementów uogólnionych zaburzeń metabolicznych. W przypadku odwarstwienia siatkówki choroba ma charakter lokalny i poza oczywistymi przyczynami jak urazy pozostaje w dużej mierze zagadkowa. Jak dotąd nie udało się wypracować jednolitej kwalifikacji PVR w zależności od przyczyn, co wynika z wielu czynników, ale licznych potencjalnych mechanizmów prowadzących do uruchomienia niekorzystnej przebudowy tkanek. Zarówno patogeneza PVR jak i mechanizmy jego powstawania pozostają nie do końca jasne. Autorka po przeanalizowaniu piśmiennictwa skierowała się w kierunku diagnostyki molekularnej na poziomie mikroRNA. Cząsteczki te biorą

udział w regulacji ekspresji genów, a wobec złożoności przyczyn PVR mogą mieć udział w jego powstawaniu.

Z zainteresowaniem zapoznałem się ze wstępem definiującym patofizjologię opisywanej choroby, ale i opisującym rolę komórek nabłonka barwnikowego siatkówki, gleju, makrofagów, czynników wzrostu komórek i licznych cytokin. Autorka wyjaśnia szczegółowo ich udział w rozwoju choroby, aby następnie przejść do szczegółów leczenia chirurgicznego i potencjalnych form farmakoterapii. Z rozdziału wynika dlaczego swoje badania kieruje właśnie w stronę miRNA.

W rozdziale „Założenia i cele” doktorantka definiuje założenia poznawcze oraz zakres w zasadzie dwóch niezależnych badań. W pierwszym ocenia ekspresję miRNA w cieple szklistym u pacjentów z PVR, w drugim zaś rolę biologiczną wybranego miRNA, w tym wypadku let-7b na przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT) komórek nabłonka barwnikowego siatkówki. Weryfikuje tu hipotezę, że wyłączenie funkcji miRNA (let-7b) pozwala na zmniejszenie indukcji EMT przez obecne w cieple szklistym mediatory (TGF β), czyli zahamowanie zdolności tworzenia błon proliferacyjnych na siatkówce.

Szczegółowo cele pracy określa w 4 punktach:

1. Ocena zawartości miRNA w egzosomach ciała szklistego oraz przydatności ciała szklistego jako materiału diagnostycznego do badań nad rolą miRNA jako potencjalnych biomarkerów wystąpienia PVR,
2. Poznanie globalnego profilu ekspresji egzosomalnego miRNA w cieple szklistym u pacjentów z PVR oraz wytypowanie miRNA, których ekspresja różni się istotnie w stosunku do grupy porównawczej,
3. Ocena wpływu indukcji EMT w linii komórek RPE na ekspresję let-7b,

4. Określenie roli let-7b w procesie EMT komórek RPE poprzez ocenę wpływu transfekcji linii komórek RPE antagonistą let-7b na morfologię, apoptozę i proliferację komórek RPE oraz ekspresję markerów EMT.

Rozdział „Materiał i metody” rozpoczyna informacją o grupach badanych chorych i kryteriach włączenia i wyłączenia z badania. Doktorantka szczegółowo opisuje technikę pozyskiwania materiału do badań, izolacji egzosomów z ciała szklanego oraz wyjaśnia technikę qPCR. Dalej opisuje szczegółowo część laboratoryjną w zakresie hodowli komórkowej, określając kryteria i zasadność obranych metod diagnostycznych wraz z opisem każdej z nich. Do analizy doktorantka adekwatnie dobiera metody statystyczne.

Badanych jest 372 wariantów miRNA, jedno wyróżnia się szczególnie to let-7b-5p. Ulega ono istotnie wyższej ekspresji u pacjentów z PVR. Dalej badanie przenosi się do laboratorium. Doktorantka analizuje, jak indukcja EMT wpływa na zmianę ekspresji wybranego miRNA wytypowanego na podstawie pierwszej części eksperymentu (let-7b-5p). Sięga tu po wzorcową linię komórkową nabłonka barwnikowego siatkówki ARPE-19 i poddaje ekspozycji na TGFβ2, indukując w komórkach proces EMT. Doktorantka dowodzi, że transfekcja linii ARPE-19 inhibitorem let-7b zmniejsza wpływ TGFβ2 na komórki RPE.

Rozdział „Wyniki” dowodzi słuszności obranej drogi badania, a doktorantka szczegółowo przedstawia wyniki badań i logiczne konsekwencje z nich płynące. Ta część pracy zilustrowana jest wieloma rycinami dokumentującymi wyniki pracy. Należy podkreślić użycie nowatorskich i celnych metod doboru materiału badawczego.

W „Dyskusji” doktorantka krytycznie analizuje zasadność metody badawczej, co dowodzi dojrzałości naukowej i umiejętności obrania właściwej taktyki badawczej. Swoje spostrzeżenia i wyniki konfrontuje z nielicznymi w tej dziedzinie danymi literaturowymi. Wskazuje na wysoki potencjał diagnostyczny badań nad miRNA, ale i definiuje dalsze potencjalne kierunki poszukiwań.

Wnioski zawarte w pracy odpowiadają na postawione cele badawcze, co więcej otwierają nowe obszary przyszłych badań nad rolą miRNA, zastosowaniem specyficznych inhibitorów czy opracowaniem metod zapobiegania rozwojowi EMT, a w domyśle zastosowaniu tych metod klinicznie.

Podsumowując, rozprawa liczy 93 strony. Układ pracy jest przejrzysty, podzielony typowo zgodnie z metodyką powszechnie przyjętą w rozprawach doktorskich. Dobór metod badawczych jest właściwy do przedstawionych założeń pracy, a krytyczne podejście doktorantki do tematu budzi uznanie. Doktorantka szeroko dobiera literaturę, a cytowania w liczbie 236 rekordów potwierdzają, że doktorantka szczegółowo zapoznała się z obraną problematyką i posiada właściwy warsztat naukowy. Praca zawiera znakomity materiał ilustracyjny szczegółowo opisujący wyniki i ułatwiający zrozumienie toku myślenia doktorantki. W pracy nie dostrzegam istotnych błędów pomniejszających jej wartość.

Przedstawiona do recenzji rozprawa lek. Agnieszki Rafalskiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Wnoszę zatem prośbę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Agnieszki Rafalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Oceniając wysoko poziom pracy i jej nowatorstwo zwracam się do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie. Argumentami przemawiającymi za wyróżnieniem są:

1. Zastosowanie nowatorskich metod badań mikroRNA i celne ukierunkowanie toru badawczego z zastosowaniem adekwatnych i doskonale dobranych metod analizy
2. Wykazanie potencjału diagnostycznego i terapeutycznego podtypu mikroRNA u chorych z PVR oraz udowodnienie wpływu inhibicji let-7b na procesy EMT w linii komórek nabłonka barwnikowego na poziomie badań in vitro

ADIUNKT
Katedry i Oddziału Klinicznego Okulistyki
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
dr hab. n. med. Dariusz Dobrowolski

