

Prof. dr hab. n. med. Ewa Mrukwa-Kominek  
Klinika Okulistyki Katedry Okulistyki WNMK  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Katowice, 19.09.2022

**OCENA**  
**rozprawy na stopień doktora nauk medycznych**  
**lekarza Agnieszki Rafalskiej**  
**pt.: „Zmiany ekspresji mikroRNA w ciele szklistym w proliferacyjnych chorobach**  
**siatkówki”**

Siatkówka oka charakteryzuje się dużą aktywnością metaboliczną, a jej prawidłowe funkcjonowanie wymaga kontaktu fotoreceptorów z warstwą nabłonka barwnikowego. Odwarstwienie siatkówki, czyli oddzielenie siatkówki neurosensorycznej od znajdującego się pod nią nabłonka barwnikowego, szybko prowadzi do nieodwracalnych zmian troficznych. Odwarstwienie siatkówki otworopochodne jest w okulistyce stanem nagłym, a brak leczenia nieuchronnie prowadzi do ślepoty. Odwarstwienie siatkówki leczy się chirurgicznie, jednak szacuje się, iż w około 10% przypadków choroba powraca z powodu rozwoju witreoretinopatii proliferacyjnej - PVR.

Mimo, iż proces PVR został opisany w 1983 roku i od tego czasu nie osiągnięto znaczących postępów w jego leczeniu. Istotą choroby jest nadmierna intensyfikacja procesów gojenia, prowadząca do powstania błon spinających powierzchnię siatkówki, i zaburzających jej strukturę wewnętrzną. Jednym z najważniejszych mechanizmów zaangażowanych w rozwój PVR jest przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT). Pod jego wpływem komórki nabłonkowe zmieniają swoje właściwości, nabywając zdolność do migracji, proliferacji, kurczenia się i produkcji cytokin oraz macierzy zewnątrzkomórkowej.

W pewnych warunkach komórki po procesie EMT mogą zostać przekształcone z powrotem w komórkę nabłonkową w odwrotnym procesie znanym jako przejście mezenchymalno-nabłonkowe (MET). Badania wskazują, że takie manipulacje w zmianie fenotypu komórek są możliwe. Odwrócenie procesu EMT w komórkach RPE przyczynia się do powrotu do nabłonkowej morfologii i pomaga w utrzymaniu ich funkcji fizjologicznych.

Uważa się, że indukcja procesu MET może stanowić nową strategię w leczeniu chorób proliferacyjnych siatkówki, zwłaszcza PVR. Ponieważ procesy EMT i MET są regulowane przez miRNA, czyli małe niekodujące RNA, duże nadzieje wiąże się z możliwością wykorzystania miRNA w terapii.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. Agnieszki Rafalskiej dotyczy bardzo ważnego w okulistyce tematu, gdyż witreoretinopatia proliferacyjna, będąca główną przyczyną niepowodzeń w chirurgii siatkówki, stanowi wyzwanie terapeutyczne. Doktorantka postawiła sobie ambitny cel określenia ekspresji miRNA w ciele szklistym pacjentów z otworopochodnym odwarstwieniem siatkówki oraz jego powiązania z rozwojem PVR. Pewne wątpliwości budzi tytuł rozprawy, gdyż może sugerować, że badaniu zostali także poddani pacjenci z innymi niż PVR schorzeniami proliferacyjnymi, w szczególności z retinopatią cukrzycową. Tytuł należy zrewidować podczas przygotowania badania do publikacji.

Rozprawa doktorska posiada ogólnie przyjęty układ dla tego typu dysertacji, liczy 93 strony, w tym streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz zastosowanych skrótów. Z obowiązku recenzenta odnotowuję, że dołączenie spisu rycin i tabel wpłynęło by pozytywnie na odbiór pracy.

Rozdział „Wstęp” zajmujący 21 stron został podzielony na podrozdziały, których lektura pozwala wprowadzić czytającego do problematyki poruszanej w dalszej części pracy. Autorka przytacza podstawowe informacje o operacji witrektomii, stosowanej między innymi w leczeniu odwarstwienia siatkówki. Następnie bardzo szczegółowo analizuje obraz kliniczny, klasyfikację, czynniki ryzyka, patogenezę oraz obecnie stosowane metody leczenia PVR. Doktorantka posiada rozległą wiedzę dotyczącą tematu. Ostatnia część wstępu dotyczy miRNA. W porównaniu do wysokiej szczegółowości wcześniejszych części, opisy dotyczące miRNA wykonane są zbyt pobieżnie.

Celem rozprawy doktorskiej było pogłębienie wiedzy na temat roli miRNA w patogenezie PVR. Dla realizacji celu Doktorantka podzieliła badanie na dwie części. W pierwszej określała zmiany ekspresji miRNA w ciele szklistym u pacjentów z PVR względem grupy porównawczej, w drugiej części analizowała rolę wytypowanego na podstawie pierwszego etapu miRNA w procesach komórkowych związanych z rozwojem PVR.

Szczegółowymi celami badawczymi były:

1. Ocena zawartości miRNA w egzosomach ciała szklanego oraz przydatności ciała szklanego jako materiału diagnostycznego do badań nad rolą miRNA jako potencjalnego biomarkera wystąpienia PVR.
2. Poznanie globalnego profilu ekspresji egzosomalnego miRNA w ciele szklanym u pacjentów z PVR oraz wytypowanie miRNA, których ekspresja różni się istotnie w stosunku do grupy porównawczej.
3. Ocena wpływu indukcji procesu 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.

Należy zwrócić uwagę, że ze względu na dwuetapowy charakter przeprowadzonych badań, już na etapie opisu celów pojawiają się odniesienia do wyników pierwszego etapu (cele numer 3 i 4). Doktorantka przedstawiła jednak zwięzłe wyjaśnienie tego faktu na początku rozdziału, co znacznie ułatwia zrozumienie konstrukcji pracy.

W rozdziale „Materiał i metody” lek. Agnieszka Rafalska omawia materiał kliniczny, kryteria włączenia oraz wyłączenia z badania. Uznanie budzi dobór pacjentów do grupy kontrolnej, uwzględniający zasady etyki. Doktorantka szczegółowo przedstawia metodykę profilowania ekspresji miRNA, hodowli komórkowej oraz indukcji procesu EMT. Analizę statystyczną otrzymanych wyników opracowano zgodnie z ogólnie przyjętymi regułami. Zasadność wykorzystanych testów statystycznych nie budzi wątpliwości.

Wyniki swoich badań Doktorantka przedstawia na 11 stronach, posiłkując się 9 rycinami oraz 2 tabelami. Zwraca uwagę mała homogenność grupy badanej, obejmującej pacjentów zarówno z pierwotnym, jak i nawrotowym odwarstwieniem siatkówki oraz z różnym czasem trwania objawów. Punktem wspólnym jest natomiast jednakowy stopień zaawansowania PVR, określony zgodnie ze Zrewidowaną Klasyfikacją PVR Towarzystwa Siatkówkowego Amerykańskiej Akademii Okulistyki.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka stwierdziła, że let-7b ulega istotnie wyższej ekspresji w ciele szklanym u pacjentów z PVR. Z tego powodu let-7b zostało wytypowane do pogłębionej analizy funkcjonalnej w dalszym etapie eksperymentu. Doktorantka użyła linii komórkowej ARPE-19. Poddano ją ekspozycji na TGFβ2, indukując w komórkach RPE proces EMT. Skuteczność indukcji potwierdzono oznaczając poziom

ekspresji wybranych markerów oraz poprzez obserwację zmiany morfologii komórek, co zostało udokumentowane wysokiej jakości materiałem graficznym.

W ostatnim etapie eksperymentu wykazano, że transfekcja linii komórkowej ARPE-19 inhibitorem let-7b-5p hamuje istotnie wywołany przez TGF $\beta$ 2 proces EMT. Transfekcja samym inhibitorem let-7b-5p, bez obecności TGF $\beta$ 2, nie powoduje istotnych zmian w fenotypie komórek RPE. Jednocześnie wykazano, że proces transfekcji inhibitorem let-7b-5p nie jest dla komórek RPE toksyczny.

Osiemnastostronicowy rozdział „Dyskusja” jest podsumowaniem danych z współczesnego piśmiennictwa dotyczącego tematu, które Doktorantka w pewnym zakresie konfrontuje z uzyskanymi przez siebie wynikami. Jednakże nowatorski charakter badań sprawia, że danych porównań z literatury nie jest zbyt wiele.

Doktorantka poruszając ważne kwestie dotyczące metodyki badań, podkreśla jak dobór poszczególnych metod może istotnie wpływać na otrzymane wyniki. Zwraca też uwagę na nowatorskie aspekty swojej pracy, takie jak zastosowanie metody qPCR do oznaczania ekspresji miRNA, czy przeprowadzenie izolacji miRNA z egzosomów ciała szklistego. Wykorzystanie nowoczesnych metod podnosi wartość merytoryczną pracy.

Wydawało by się, że słabą stroną pracy jest niewielka grupa pacjentów. Jednak z uwagi na nowatorskość jest ona wystarczająca do porównania z danymi piśmiennictwa. Należy także zwrócić uwagę, że analizie została poddana bardzo duża liczba miRNA. Co więcej, dzięki dodatkowej analizie wpływu let-7b na proces EMT, praca zyskuje unikatowy charakter, co pozwala przypuszczać, że wyniki będą mogły być opublikowane w wysoko punktowanych czasopismach.

Lek. Agnieszka Rafalska na podstawie uzyskanych i przeanalizowanych wyników wyciąga wnioski, które stanowią odpowiedź na postawione cele pracy. Stwierdza, że ciało szkliste jest cennym materiałem do badań nad rolą miRNA jako biomarkerów w PVR. Wykazuje, że w ciele szklistym u pacjentów z PVR dochodzi do wzmożonej ekspresji let-7b. Na podstawie drugiego etapu badania doktorantka wyciąga wnioski, że indukcja EMT przy pomocy TGF $\beta$  nie wpływa istotnie na ekspresję let-7b, natomiast wzmożona ekspresja let-7b może przy obecności mediatorów zapalnych w ciele szklistym korelować z rozwojem PVR. Wnioski zostały przedstawione przejrzysto i zrozumiale.

Piśmiennictwo obejmuje 236 pozycji literatury zagranicznej, wśród których większość ukazała się w ostatnich 10 latach. Literatura została prawidłowo dobrana. Należy odnotować brak literatury polskiej, co świadczy również o nowatorskim charakterze pracy. Zwraca także

uwagę niejednorodne formatowanie literatury w piśmiennictwie. Uzupełnienia wymaga także kilka pozycji (np. data w pozycji 233). Uwagi wynikające z obowiązku recenzenta nie umniejszają wartości pracy.

Poddana ocenie dysertacja jest oryginalnym wkładem autorki do wiedzy na bardzo aktualny i nowatorski problem. Porusza ważny temat patofizjologii rozwoju i możliwości leczenia PVR. Doktorantka prezentuje bardzo wysoki warsztatu poziom naukowo-badawczego. Daje się także poznać jako sprawny badacz, łączący wiedzę okulistyczną z tą w zakresie wymagającej technicznie i merytorycznie analizy miRNA. Na uznanie zasługuje również wybór tematu, bardzo aktualnego, wpisującego się w nowoczesne trendy badań naukowych.

Mając na uwadze wartość merytoryczną i praktyczną Rozprawy Doktorskiej lek. Agnieszki Rafalskiej zatytułowanej „**Zmiany ekspresji mikroRNA w ciele szklistym w proliferacyjnych chorobach siatkówki**” zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na uwadze powyższe oraz nowatorski charakter badań, wnioskuję o wyróżnienie Rozprawy.

*Prof. dr hab. n. med. Ewa Mrukwa-Kominek*

KIEROWNIK

Katedry Okulistyki

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

*prof. dr hab. n. med. Ewa Mrukwa-Kominek*