

Katowice 2020-02-26

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DISCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	03-03-2020
L. dz. RN-III/	354/2020

Sz. P.

Prof. dr hab. n. med. Grzegorz Mazur

Przewodniczący Rady Dyscypliny Naukowej
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej magister Natalii Kingi Słoki
z tytułowanej

Profil miRNA w surowicy u pacjentek z zespołem
policystycznych jajników (PCOS)

Zespół policystycznych jajników (PCOS) to najczęstszy heterogenny zespół endokrynni kobiet w wieku rozrodczym, którego częstość występowania to 8–15% populacji kobiet. Obraz kliniczny wykazuje dużą zmienność w zależności od czynników etnicznych i środowiskowych. Do tej pory nie została wyjaśniona dokładna patogeneza PCOS. Wiadomo, że na rozwój patologii jajników mają wpływ m.in.: zwiększone stężenie androgenów, nadmierne uwalnianie hormonu luteinizującego oraz wysoki poziom insuliny. Brane są też pod uwagę czynniki immunologiczne i stres oksydacyjny. Zauważono częstsze występowanie zespołu u kobiet urodzonych z niską masą urodzeniową, przedwcześnie dojrzewających płciowo z menarche poniżej 12 roku życia, szczególnie skojarzone z nadwagą. Badane są genetyczne podstawy występowania PCOS. Wytypowano geny kandydackie odpowiedzialne za steroidogenezę, działanie gonadotropin, rozwój otyłości,

str. 1

insulinooporność, czy regulacje przemian energetycznych, ale nie odkryto jeszcze żadnego z nich jednoznacznie odpowiedzialnego za PCOS. Prawdopodobnie mamy tu do czynienia z wielogenowym dziedziczeniem tej jednostki chorobowej i znacznym wpływem na nie czynników epigenetycznych.

Prowadzone badania nad patofizjologią PCOS oraz poszukiwania nowych czynników, być może związanych etiologicznie z PCOS, poszerzają naszą wiedzę na ten temat tej choroby. Zatem cenna jest każda inicjatywa badawcza również ta, którą podjęła Doktorantka, oceniając rolę mikroRNA, tych małych niekodujących cząsteczek RNA ale regulujących ekspresję innych genów, w aspekcie etiologii PCOS.

Obecnie przyjmuje się, że miRNA może regulować około 1/3 genów człowieka, odgrywając przez to ważną rolę w większości procesów biologicznych, wpływając m.in. na proliferację, apoptozę, różnicowanie czy metabolizm. W tej części swojej dysertacji, Doktorantka w sposób niezwykle wyczerpujący opisuje badania określające rolę mikroRNA w układzie rodny kobiecym, w procesach płodności, metabolizmie hormonów sterydowych i innych oraz otyłości. Dla mnie jako ginekologa-endokrynologa zajmującego się leczeniem niepłodności kobiet z PCOS, bardzo ciekawym i bogatym informacyjnie jest podrozdział o roli mikroRNA w płynie pęcherzykowym, w skład którego wchodzi min. hormony, czynniki wzrostu, czynniki antyapoptotyczne, białka czy nukleotydy. A rola płynu pęcherzykowego w procesach owogenezy jest nie do przecenienia, zwłaszcza w aspekcie zespołu PCO, gdzie objawem dominującym tej choroby są zaburzenia owulacji i w konsekwencji niepłodność.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska liczy łącznie 115 stron i posiada klasyczny układ dla pracy doktorskiej. Została podzielona na następujące rozdziały: wstęp, założenia i cel pracy, materiał, metodyka, wyniki i ich omówienie, wnioski, streszczenia, spis tabel i rycin oraz piśmiennictwo. Tekst pracy poprzedzony jest spisem treści, wykazem zastosowanych skrótów. Praca jest bogato ilustrowana, zawiera 12 rycin i 25 tabel.

Treść wstępu wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne i znajomość tematu badań.

Autorka jako cele pracy przedstawiła:

Określenie profilu izoform miRNA w surowicy, których stężenie różnicuje jak najmocniej heterogenną grupę badaną z PCOS od zdrowej grupy stanowiącej kontrolę.

- Ocena związku pomiędzy różnicującymi grupy miRNA a parametrami antropometrycznymi oraz biochemicznymi.

 str. 2

- Wytypowanie szlaków, które mogą być regulowane przez wyselekcjonowane miRNA, mające znaczący wpływ na patomechanizm PCOS.

Cele są jednoznacznie sformułowane, interesujące z naukowego i praktycznego punktu widzenia.

W rozdziale materiał przedstawia Doktorantka kryteria włączenia i wyłączenia badanych. Do badań zakwalifikowano 15 kobiet w wieku 19-38 lat i 17 kobiet, które stanowiły grupę badaną. Grupa kontrolna obejmowała 17 kobiet, prawidłowo miesiączkujących.

W rozdziale metodyka przedstawiono zasady rozpoznania PCOS, pomiary antropometryczne, procedury laboratoryjne oceny parametrów i metabolicznych oraz hormonalnych. Autorka opisuje na 13 stronach bardzo szczegółowo procedury badań genetycznych analizujące miRNA, kończąc ten rozdział omówieniem założeń analizy statystycznej i bioinformatycznej

Wyniki badań zostały przedstawione na 18 stronach, bogato ilustrowane są przez tabele i ryciny i są następujące:

badane z PCOS miały znacząco większe wskaźniki BMI, WHR oraz obwód talii i bioder, natomiast bez różnic pomiędzy grupami w zakresie ciśnienia tętniczego krwi. Grupę badaną charakteryzowały istotnie większe stężenia testosteronu całkowitego, androstendionu, siarczanu dehydroepiandrosteronu, lutropiny oraz wartość FAI. Nie obserwowano różnic w zakresie stężeń białka wiążącego hormony płciowe, folikulotropiny, estradiolu czy tyreotropiny. Kobiety z PCOS wykazywały znacząco większe stężenie insuliny oraz wartości wskaźników HOMA-IR, a wartość wskaźnika QUICKI była znacząco mniejsza. Nie wykazano natomiast różnic istotnych statystycznie w stężeniu glukozy między grupami. Nie obserwowano znaczących różnic w zakresie parametrów gospodarki lipidowej pomiędzy grupą badaną, a kontrolną. Istotność statystyczną wykazało natomiast białko C-reaktywne, którego stężenie było większe w grupie badanej.

W grupie kobiet z PCOS wykazano istotnie ($p=0,023$) wyższą ekspresję izoformy miRNA let-7e-5p względem grupy kontrolnej. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy wytypowanym miRNA let-7e-5p, a stężeniem insuliny na czczo ($R=0,531$; $p=0,00177$). Na podstawie badań biochemicznych z grupy badanej wyodrębniono podgrupę z PCOS i IR,



u której wykazano różnice w ekspresji będące istotne statystycznie dla miRNA let-7e-5p, miR-99a-5p, miR-122-5p oraz miR-361-5p względem grupy kontrolnej. Analiza korelacji nadekspresjonowanych cząsteczek miR-99a-5p, miR-122-5p z parametrami biochemicznymi wykazała, że są one związane z insuliną oraz wskaźnikiem HOMA. Natomiast analiza korelacji cząsteczki miR-361-5p o obniżonej ekspresji względem grupy kontrolnej wykazała związek z wartością FAI. Po przeprowadzonej analizie bioinformatycznej zidentyfikowano cele genowe dla let-7e-5p, które obejmowały tylko jeden szlak sygnałowy PI3K-Akt. Natomiast cele genowe dla let-7e-5p, miR-99a-5p oraz miR-122-5p wykazały cztery szlaki sygnałowe.

Pozwoliło to doktorantce na wyciągnięcie wniosków, które znakomicie odpowiadając założonym celom pracy są następujące:

kobiety z PCOS różnią się profilem miRNA w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej. Istotnie zwiększona była ekspresja let-7e-5p w surowicy kobiet z PCOS i hiperinsulinemią oraz większym wskaźnikiem HOMA-IR. Dodatkowa analiza wykazała, że IR w PCOS wpływa na zmiany w surowicy takich miRNA jak, let-7e-5p, miR-122-5p, miR-99a-5p, miR-361-5p. Zmienione ekspresje miRNA są zaangażowane w wiele ważnych ścieżek sygnałowych związanych z dysfunkcjami metabolicznymi występującymi w PCOS takimi jak, szlak sygnałowy PI3K-Akt, szlak sygnałowy Wnt, szlak sygnałowy MAPK czy szlak sygnałowy cukrzycy typu 2. Wyniki te mogą pomóc ukierunkować poszukiwania miRNA jako istotnych markerów dla PCOS i ich większego związku z zaburzeniami metabolicznymi. Potrzeba jednak dalszych badań wytypowanych miRNA przeprowadzonych na dużo większej grupie kobiet.

W liczącym 12 stron omówieniu wyników badań Doktorantka je analizuje i konfrontuje z danymi z piśmiennictwa. Dyskusja jest dojrzała a Autorka korzysta w niej w sposób właściwy z danych z piśmiennictwa. Umiejętnie posługuje się w niej argumentami przemawiającymi za wagą swoich obserwacji, ale także prezentując przeciwne dane, krytycznie przedstawia także ograniczenia własnej pracy. Powinna w tym miejscu wyraźniej zaznaczyć nowatorskie aspekty swoich badań. Sposób omówienia wyników świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnej pracy naukowej. Świadczy także o tym podrozdział o ograniczeniach metod badawczych.



Piśmiennictwo obejmujące 198 pozycji, głównie anglojęzycznych z ostatnich lat jest uszeregowane w kolejności cytowań. Zostało ono poprawnie dobrane i umiejętnie wykorzystane w tekście pracy.

Zwróciłbym uwagę tylko na fakt, iż idealną grupą do badań jest grupa jednorodna fenotypowo w PCOS, bowiem pozwala to na ustosunkowanie się do ewentualnego zarzutu odmienności wyników w różnych fenotypach tej jednostki chorobowej.

Powyższa uwaga w niczym nie umniejsza merytorycznej bardzo wysokiej wartości tej rozprawy.

Z satysfakcją podkreślić muszę, iż ta dysertacja jest absolutną nowością w Polsce, w zakresie badań nad rolą mikroRNA w zespole PCO, uzupełniając naszą wiedzę nad tą ciągle niepoznaną do końca chorobą.

Nie zgłaszam żadnych zastrzeżeń merytorycznych ani formalnych do tekstu rozprawy, praca jest przejrzysta, napisana poprawnie stylistycznie.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja stanowi samodzielny fragment badań naukowych i stanowi cenny, nowatorski wkład w poznanie etiopatogenezy PCOS.

Rozprawa doktorska pt. „Profil miRNA w surowicy u pacjentek z zespołem policystycznych jajników (PCOS)” magister Natalii Kingi Słoki, spełnia warunki kreślone 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.).

Mam zatem zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie magister Natalii Kingi Słoki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie wnioskuję do Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o wyróżnienie tej pracy, bowiem jest ona nowatorska w zakresie badań nad etiopatogenezą PCOS, jest precyzyjnie zaplanowana i bezbłędnie przeprowadzona a dojrzała dyskusja potwierdza nie tylko dużą wiedzę Doktorantki w tym zakresie, ale przede wszystkim Jej dojrzałość jako badacza.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Klinika Endokrynologii Ginekologicznej
Katedry Ginekologii i Położnictwa
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. Paweł Madej