

Kraków, 14.04. 2020 r.

Dr hab. n. med. Agata Bałdys-Waligórska  
Katedra Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii  
Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego  
ul. G. Herlinga-Grudzińskiego1  
30-705 Kraków

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Mgr Natalii Kingi Słoki**

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

Promotor:

**prof. dr hab. n. med. Marek Bolanowski**

Zespół wielotorbielowatych jajników (PCOS) jest jedną z najczęściej rozpoznawanych endokrynopatii u kobiet w wieku reprodukcyjnym, w którym obok zaburzeń miesiączkowania, braku owulacji, niepłodności i hiperandrogenizmu, występują istotne zaburzenia metaboliczne takie jak otyłość brzuszna, insulinooporność (IR) czy dyslipidemia aterogenna, które są udokumentowanymi czynnikami ryzyka wystąpienia zespołu metabolicznego (MS).

Etiopatogeneza PCOS nie jest do końca wyjaśniona. Istnieje kilka teorii PCOS biorących pod uwagę czynniki genetyczne, przedwczesną adrenarche, zaburzenia pulsacji GnRH powodujące nadmierne wydzielanie LH, defekt syntezy androgenów jajnikowych i/lub nadnerczowych, a także insulinooporność, wiążącą PCOS z zespołem metabolicznym, którego częstość u kobiet z PCOS jest dwa razy większa niż w populacji ogólnej. W patogenezie zespołu metabolicznego niewątpliwą rolę oprócz IR odgrywa również przewlekły stan zapalny o niskim stopniu nasilenia, o czym świadczą podwyższone stężenia białka C-reaktywnego (CRP) i niektórych cytokin, źródłem których może być tkanka tłuszczowa.

Pomimo wielu badań i różnych koncepcji patomechanizmu PCOS, brakuje markera dla PCOS, który byłby pomocny w postawieniu jednoznacznej diagnozy, a tym samym przyspieszyłby wdrożenie odpowiedniego leczenia.

Od kilku lat publikuje się coraz więcej prac wskazujących na udział miRNA w patomechanizmie różnych chorób, w tym również PCOS. MiRNA są małymi niekodującymi cząsteczkami, które wiążąc się z regionem niepodlegający translacji (3'UTR) genów docelowych, uniemożliwiają dalszą translację genu, regulując wiele procesów biologicznych. Szacuje się, że miRNA może regulować około 30% genów człowieka, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych. Profil ekspresji miRNA w różnych płynach ustrojowych nie jest przypadkowy i wskazuje, że miRNA są wydzielane selektywnie w zależności od stanu patofizjologicznego, podobnie jak np. biomarkery w chorobach nowotworowych. Nieprawidłowa ekspresja miRNA została już stwierdzona u pacjentów z cukrzycą, endometriozą, czy nowotworami.

Dlatego też, określenie profilu ekspresji mikroRNA u pacjentek z PCOS podjęte przez Doktorantkę może przyczynić się do lepszego poznania patofizjologii choroby, ułatwić diagnostykę i wspierać decyzje terapeutyczne.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych mgr Natalii Kingi Słoki została przedstawiona do recenzji jako opracowany 115. stronicowy maszynopis zawierający 25 tabel i 12 rycin, 198 pozycji piśmiennictwa ułożonych w kolejności alfabetycznej. Praca ma typowy układ rozdziałów, są to: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metodyka, wyniki badań, omówienie wyników badań, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis tabel i rycin, piśmiennictwo.

## **Wstęp**

W obszernym i dobrze udokumentowanym przeglądzie piśmiennictwa wstępie, Autorka pracy zdefiniowała zespół policystycznych jajników i kryteria rozpoznania oraz przedstawiła jego epidemiologię.

Przedstawiła też wyczerpująco wyniki dotychczasowych badań dotyczące patogenezy zaburzeń hormonalnych (hiperandrogenizm) i metabolicznych (otyłość, insulinooporność, zaburzenia gospodarki węglowodanowej i lipidowej, nadciśnienie tętnicze). Wykazała się dobrą znajomością piśmiennictwa na temat wartości diagnostycznej tradycyjnych wskaźników zaburzeń metabolicznych i hormonalnych w zespole PCO.

Autorka omawia badania wskazujące na genetyczne pochodzenie hiperandrogenizmu i PCOS w modelu wielogenowego dziedziczenia, podobnie jak w cukrzycy typu 2, modyfikowanego dodatkowo przez czynniki środowiskowe.

W kolejnym rozdziale Autorka omawia udział mikroRNA w regulacji funkcji układu rozrodczego począwszy od rozwoju tych narządów do kontroli prawidłowego wzrostu pęcherzyka jajnikowego. Badania te sugerują że miRNA odgrywają ważną rolę w patofizjologii PCOS, a profil mikroRNA komórek ziarnistych pacjentek z PCOS pokazuje, że regulują one apoptozę i proliferację tych komórek. Również komórki warstwy tekalnej wykazują nieprawidłową ekspresję mikroRNA powiązaną z hiperandrogenizmem i rozwojem PCOS.

Autorka zwraca również uwagę na dostępność miRNA w płynie pęcherzykowym. Analiza ekspresji miRNA w ludzkim płynie pęcherzykowym wykazała różnice pomiędzy stężeniem tych cząsteczek u pacjentek z PCOS w porównaniu ze zdrowymi kontrolami.

Odkrycie mikroRNA i wyniki badań przemawiające za genetycznym podłożem PCOS skłoniło Doktorantkę Panią mgr Natalię Kingę Słoka do zaplanowania niniejszych badań.

## **Cel pracy**

Autorka pracy założyła, że porównanie profilu ekspresji miRNA w surowicy kobiet z PCOS i grupy kontrolnej, pozwoli na znalezienie nieinwazyjnego biomarkera choroby, a analiza bioinformatyczną uzyskanych wyników pomoże lepiej poznać mechanizm PCOS.

Wyznaczone cele pracy to:

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

Cel rozprawy został sformułowany jasno, jest dobrze uzasadniony, dobór tematu oceniam jako interesujący i istotny klinicznie, wnoszący nowe podejście do tematu PCOS.

## **Material i Metody**

W pracy doktorskiej wykorzystano zebrane wcześniej dane oraz materiał biologiczny od pacjentek uczestniczących w projekcie badawczym „Polimorfizm genu receptora CNR1, a predyktory chorób układu krążenia u kobiet z zespołem wielotorbielowatych jajników” (grant NCN nr 3188/B/P01/2010/3).

Badanie zostało sfinansowane jako projekt uczelniany dla młodych naukowców (STM.C120.16.012) pt.: ”Profil miRNA w surowicy u pacjentek z zespołem policystycznych jajników (PCOS)” realizowanego w latach 2016-2018.

Program badań został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (Nr KB – 344/2016).

Do badania wykorzystano surowicę krwi zamrożoną w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  od 15 kobiet z PCOS oraz 17 kobiet zdrowych stanowiących grupę kontrolną w wieku od 19 do 38 lat w trakcie pobierania materiału, zdiagnozowanych w Katedrze i Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. PCOS został rozpoznany zgodnie z kryteriami Rotterdamskimi.

Doktorantka określiła dokładnie kryteria wyłączenia z badania.

Od każdej uczestniczki projektu zebrano wywiad chorobowy i wykonano następujące badania:

- Pomiar ciśnienia tętniczego
- ocena parametrów antropometrycznych (masa ciała, wzrost, BMI, WHR),
- badania hormonalne (stężenie PTH, testosteronu, LH, FSH, E<sub>2</sub>, SHBG),
- badania metaboliczne (stężenie glukozy i insuliny, HOMA-IR, QUICKI, hsCRP),
- profil lipidowy (cholesterol całkowity, HDL-C i trójglicerydy, LDL-C (wg wzoru Friedewalda), wyliczono AIP (*atherogenic index of plasma*),

U wszystkich kobiet wyizolowano całkowity RNA z surowicy, a następnie przeprowadzono syntezę cDNA. Ekspresję 179 miRNA charakterystycznych dla surowicy, przeprowadzono z wykorzystaniem techniki real-time PCR. Oceniono jakość RNA wyizolowanego z surowicy na podstawie następujących parametrów:

- wydajność izolacji RNA,
- obecność inhibitorów procesów enzymatycznych podczas syntezy cDNA,
- obecność nukleaz,
- obecność RNA pochodzącego z kontaminacji materiału komórkami lub z hemolizy.

Zweryfikowano jakość danych i oceniono odsetek uzyskanych odczytów. Porównano poziomy ekspresji cząstek miRNA pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Wartości p mniejsze niż 0,05 zostały uznane za istotne statystycznie.

Dla miRNA o podwyższonej lub obniżonej ekspresji w porównaniu do grupy kontrolnej przeprowadzono analizę bioinformatyczną w celu powiązania wytypowanych celów genowych z ich funkcjami w organizmie, przy wykorzystaniu bazy danych KEGG (ang. *Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes*), za pomocą oprogramowania DIANA-miRPath w wersji 3.0.

## Wyniki

W omawianej pracy Autorka wykazała, że kobiety z PCOS charakteryzowały się istotnie wyższymi wartościami **pomiarów antropometrycznych** (BMI, obwód bioder, obwód talii WHR), a także istotnie wyższymi stężeniami badanych **parametrów metabolicznych** (stężenie insuliny na czczo, wskaźnik HOMA). Wskaźnik insulinowrażliwości QUICKI był istotnie niższy w grupie kobiet z PCOS w stosunku do grupy kontrolnej. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami w zakresie lipidogramu. Stężenie **wskaźnika zapalnego CRP** było istotnie wyższe w grupie PCOS, aczkolwiek w obu grupach stężenie CRP mieściło się w zakresie normy.

W testach hormonalnych pacjentki z PCOS charakteryzowały się znacząco większym stężeniem testosteronu całkowitego, androstendionu, DHEAS, LH oraz wartością FAI.

**Zespół metaboliczny (MS)** zgodnie z kryteriami NCEP-ATP III (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel, NCEP-ATP III*) [134] został stwierdzony u 26,7% kobiet z zespołem policystycznych jajników.

Wyniki badań genetycznych są wiarygodne, ponieważ zdecydowana większość próbek miała powyżej 90% prawidłowo zebranych odczytów.

Analiza wyników wykazała różnicę w ekspresji dwóch miRNA w grupie PCOS względem grupy kontrolnej: **hsa-let-7e-5p** oraz **hsa-miR-16-5p**. Ekspresja izoformy **hsa-let-7e-5p** była znamienne wyższa w grupie PCOS niż w grupie kontrolnej. Poziom ekspresji jest **hsa-miR-16-5p** był znacząco obniżony w grupie badanej, ale nieznamienne statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej. Wykazano silną dodatnią korelację pomiędzy miRNA let-7e-5p, miRNA-99a-5p oraz miRNA-122-5p, a stężeniem insuliny na czczo i wskaźnikiem HOMA. Ze względu na konieczność sprawdzenia hipotezy czy w grupie badanej istnieją różniące się podgrupy, grupę badaną podzielono na podgrupę PCOS i PCOS z IR według wartości współczynnika insulinooporności HOMA, w 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 cząsteczki miR-361-5p o obniżonej ekspresji względem grupy kontrolnej wykazała istotny statycznie związek z wartością FAI.

Tylko jedna cząstka ulegała nadmiernej ekspresji w grupie badanej - **hsa-let-7e-5p** w porównaniu do grupy kontrolnej, celem genowym dla tej cząsteczki w analizie bioinformatycznej jest szlak sygnałowy PI3K-Akt.

Natomiast celem genowym dla let-7e-5p, miR-99a-5p oraz miR-122-5p okazały się cztery szlaki sygnałowe: Wnt, MAPK, szlak cukrzycy typu 2 oraz szlak sygnałowy PI3K-Akt.

**Dyskusja** Autorki z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy została przeprowadzona wnikliwie i świadczy o dużej znajomości zagadnień związanych z zespołem PCO oraz z zespołem metabolicznym.

Doktorantka wykazała się dużą znajomością piśmiennictwa na temat stosunkowo niedawno odkrytych związków pomiędzy obecnością miRNA w surowicy pacjentek z PCOS, a występowaniem otyłości/nadwagi, hiperandrogenizmu, insulinooporności i zespołu

metabolicznego. Należy jednak podkreślić, że publikacji koncentrujących się na związku różnych cząsteczek mikroRNA z PCOS jest niewiele, a w piśmiennictwie polskim w ogóle brak badań oceniających profil miRNA w surowicy pacjentek z PCOS, przeprowadzonych na populacji polskiej.

Doktorantka w swoich badaniach wykazała, że jedyną cząsteczką, której ekspresja była istotnie wyższa w PCOS w porównaniu z grupą kontrolną, było mikroRNA hsa-let-7e-5p, które pozytywnie korelowało ze stężeniem insuliny oraz wskaźnikiem HOMA pacjentek, a więc dwoma bardzo istotnymi zaburzeniami metabolicznymi w PCOS: hiperinsulinemią i insulinoopornością. Dotychczas w żadnej publikacji nie opisywano cząsteczki mikroRNA let-7e-5p w surowicy czy innych materiałach biologicznych pacjentek z PCOS.

MiRNA let-7e-5p jeszcze bardziej różnicowało wydzieloną podgrupę PCOS z IR od grupy kontrolnej, podobnie jak miR-99a-5p, miR-122-5p oraz miR-361-5p. Autorka przeprowadziła również analizę bioinformatyczną w celu powiązania wytypowanych celów genowych z ich funkcjami w organizmie, w której wykazała, że mogą one uczestniczyć w szlaku sygnałowym Wnt, szlaku sygnałowym MAPK, szlaku sygnałowym związanym z T2D, oraz szlaku sygnałowym PI3K-Akt. Tak więc, Autorka wykazała powiązania wytypowanych miRNA nie tylko z PCOS, ale również z pewnymi szlakami sygnałowymi, co potencjalnie może mieć znaczenie kliniczne w wykorzystaniu miRNA jako markerów tej choroby.

### **Wnioski:**

Doktorantka podsumowuje dyskusję następującymi wnioskami:

1. „Obecne wyniki sugerują, że PCOS i jego związek z dysfunkcją metaboliczną znajduje swoje odzwierciedlenie w profilu miRNA. Może to w przyszłości pomóc w poszukiwaniu takich miRNA, które będą klinicznie istotne dla tego zespołu i będą stanowiły swoisty biomarker dla tej jednostki chorobowej.
2. Ekspresja let-7e w surowicy była istotnie zwiększona u osób z hiperinsulinemią oraz większym wskaźnikiem HOMA, różnicując grupę PCOS od osób z grupy kontrolnej.
3. Wyniki sugerują, że IR w PCOS wpływa na różnice w profilu mikroRNA występujących w surowicy, takich jak let-7e-5p, miR-122-5p, miR-99a-5p, miR-361-5p. Odkrycia te mogą pomóc ukierunkować poszukiwania miRNA jako klinicznie istotnych markerów dla PCOS i ich większego związku z dysfunkcją metaboliczną w przyszłych badaniach.
4. Analiza bioinformatyczna wykazała istnienie wielu szlaków sygnałowych uczestniczących w IR regulowanych przez wytypowane miRNA (szlak sygnałowy

Wnt, szlak sygnałowy MAPK, szlak sygnałowy cukrzycy typu 2 oraz szlak sygnałowy PI3K-Akt). „

**Wnioski** z przeprowadzonej pracy są odpowiedzią na sformułowane uprzednio cele pracy badawczej, co świadczy o przemyślanym zaplanowaniu pracy i realizacji wszystkich jej założeń.

W podsumowaniu Doktorantka krytycznie ustosunkowała się do uzyskanych wyników, analizując ograniczenia wykonanych badań, takie jak mała liczebność grupy badanej i kontrolnej, która być może była przyczyną braku znamiennych różnic pomiędzy grupami w profilu lipidowym, stężeniu CRP czy glikemii. Zmiany stężeń niektórych miRNA również mogły pozostać niezauważone z powodu małej liczebności grup. Materiałem biologicznym w tym badaniu jest surowica krwi zawierająca różne miRNA pochodzące z różnych typów komórek, co utrudnia niewątpliwie analizę i znalezienie markerów związanych z PCOS i insulinoopornością.

Przedstawiona do recenzji praca posiada dużą wartość merytoryczną ponieważ dotyczy mało poznanej roli miRNA w patogenezie zespołu metabolicznego i zespołu PCO. W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest takich badań. Doktorantka wykorzystuje w swojej pracy znajomość nowoczesnych metod molekularnych, którymi posługuje się ze zrozumieniem zasad poprawnego wykonania badania i analizy wyników, o czym świadczy rozdział „Materiał i Metody”.

Uważam, że uzyskane wyniki są bardzo obiecujące, wnoszą nowe informacje i są cennym wkładem w poznanie roli badanych mikroRNA w rozwoju zaburzeń metabolicznych występujących w PCOS, ale powinny być potwierdzone na znacznie większej grupie badanej zanim uznamy, że wytypowane miRNA są biomarkerami PCOS.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na pewne wątpliwości nasuwające się podczas analizy pracy, które powinny być wyjaśnione przed publikacją wyników badania. Na stronie 64 Autorka pisze, że „Najsilniejsza okazała się korelacja pomiędzy poziomem ekspresji miRNA **hsa-let-7e-5p**, a stężeniem insuliny **R = 0,531, p = 0,00177**”, podczas gdy z Tabeli 17 str. 65 wynika, że współczynnik korelacji R jest najwyższy dla insuliny i hsa-miR-122-5p oraz dla wskaźnika HOMA i hsa-miR-99a-5p, przy podobnie niskiej wartości p. Co zatem wpłynęło na taką interpretację wyników przez Autorkę.

Uważam też, że w pracy naukowej nie powinno się używać wyrażen potocznych takich jak: nadekspresjonowany, zwirowano, zwalidować itd.

Z tekstu pracy nie wynika w jakim celu oznaczano stężenie PTH.



Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki 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.). Oceniam ją bardzo wysoko za oryginalność oraz nowatorskie i molekularne podejście do tematu. Wnoszę do Wysokiej **Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu** o dopuszczenie Autorki mgr Natalii Kingi Słoki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie Autorki recenzowanej przeze mnie pracy.



Dr hab. n. med. Agata Bałdys-Waligórska

**Kraków 15. 04. 2020 r.**

**Dr hab. n. med. Agata Baldys-Waligórska, prof. nadzw.  
Katedra Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych  
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu  
Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego  
ul. Gustawa Herlinga -Grudzińskiego 1  
30-705 Krakow**

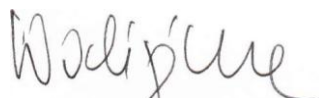
**Przewodniczący  
Rady Dyscypliny Nauki Medyczne  
Prof. dr hab. Grzegorz Mazur  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu**

Wielce Szanowny Panie Przewodniczący,

Przesyłam recenzję rozprawy doktorskiej lek. med. Natalii Kingi Słoki  
pt.: „Profil miRNA w surowicy u pacjentek z zespołem policystycznych jajników (PCOS)”  
która powstała w Katedrze i Klinice Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami pod  
kierownictwem **Prof. dr hab. n. med. Marek Bolanowskiego.**

Uprzejmie informuję, że pracę oceniam bardzo wysoko, spełnia ona całkowicie  
wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki  
Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Autorki mgr Natalii Kingi  
Słoki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku



Dr hab. n. med. Agata Baldys-Waligórska