

KLINIKA
KARDIOLOGII
Uniwersytet Medyczny
Ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A



CARDIOLOGY DEPT.

Medical University
M. Skłodowska-Curie str.24A

Tel.(+48 85) 831 86 56

Kierownik: Prof. dr hab. n. med. **BOŻENA SOBKOWICZ**

Białystok, 20.10.2021r.

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Justyny Magdaleny Pordzik pt:

**„OKREŚLENIE ZNACZENIA ROKOWNICZEGO NOWYCH MIKRORNA
ZWIĄZANYCH Z REAKTYWNOŚCIĄ PŁYTEK KRWI U PACJENTÓW
Z CUKRZYCĄ TYPU 2”**

Cukrzyca typu 2 (DM) jest chorobą metaboliczną, ale jednocześnie od końca XX wieku jest jednocześnie uznawana za chorobę sercowo-naczyniową. Wiąże się ze zwiększoną chorobowością i śmiertelnością, aż 70% pacjentów z cukrzycą ginie z powodu powikłań ze strony serca. The Emerging Risk Factor Collaboration, metaanaliza 102 prospektywnych badań, wykazała, że DM bez względu na jej typ wiąże się z dwukrotnie zwiększonym ryzykiem wystąpienia zdarzeń sercowych jak zgon z przyczyn naczyniowych, choroba niedokrwienna serca czy udar mózgu.

Wiadomo, że metabolizm obserwowany w cukrzycy upośledza funkcję śródbłonna i płytek krwi, które z kolei przyczyniają się do rozwoju powikłań naczyniowych i prozakrzepowych. Łącznie dysfunkcja płytek krwi związana z hiperglikemią, jak i stany zapalne, mogą wyjaśniać fakt, że diabetycy są wybitnie podatni na rozwój chorób serca i naczyń.

Mikro-kwasy rybonukleinowe to małe, endogenne, niekodujące RNA. Regulują znaczną część genów kodujących białka poprzez interakcję z matrycowym RNA. Znaczna ilość mikroRNA pojawia się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, w tym we krwi i innych płynach ustrojowych. Zróżnicowana ekspresja mikroRNA jest związana z różnymi schorzeniami takimi jak nowotwory, infekcje wirusowe, choroby sercowo-naczyniowe, choroby neurodegeneracyjne czy cukrzyca. Wykazano, iż płytki krwi zawierają duże ilości

mikroRNA. W konsekwencji są one głównym źródłem krążących mikroRNA, o istotnym potencjale regulacyjnym w patofizjologii sercowo-naczyniowej. Dotychczas nie badano związku pomiędzy mikroRNA a rakiem w cukrzycy. Dlatego **temat pracy lek. Justyny Pordzik** oceniam jako bardzo aktualny i mający ważne znaczenie kliniczne.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest oparta na **cyklu 3 prac**, pracy przeglądowej, pracy opartej na analizie bioinformatycznej oraz oryginalnej, opublikowanych w języku angielskim w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach *Frontiers in Endocrinology* (Lausanne) oraz *Cardiovascular Diabetology*. Łączny **Impact Factor (IF)** prac wynosi **15, 207, punkty według wykazu MNiSW: 289**. Pragnę podkreślić, że badania zostały wykonane w Projekcie DI2016 007246 realizowanym w ramach Diamentowego Grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Doktorantka jest **pierwszą Autorką** we wszystkich 3 wysoko punktowanych publikacjach, a dołączone do rozprawy oświadczenia Współautorów wskazują na znaczący indywidualny wkład Doktorantki w opracowanie koncepcji badań, zbieranie materiału, analizę i interpretację danych oraz przygotowanie tekstu manuskryptów. Przy okazji chcę dodać, że Doktorantka w tak młodym wieku ma bardzo duży dorobek naukowy, łączny Impact Factor 43,183 oraz 744 punkty Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Poza tym jest to spójny dorobek dotyczący cukrzycy, funkcji płytek krwi oraz roli mikroRNA.

Rozprawa została opatrzona spisem treści, wykazem stosowanych skrótów, streszczeniami w języku polskim i angielskim, wstępem, opisem celów pracy, opisem materiałów i metod, wykazem publikacji stanowiących rozprawę doktorską, podsumowaniem, bibliografią oraz załącznikami, w skład których wchodzi opinia Komisji Bioetycznej oraz oświadczenia Współautorów. Rozprawa obejmuje 105 stron. Całość została zredagowana bardzo przejrzysto i starannie.

Tytuł pracy właściwie odzwierciedla treść rozprawy.

We **wstępie** Doktorantka w zwięzły sposób przedstawia najważniejsze z punktu widzenia jej rozprawy doktorskiej zagadnienia z zakresu cukrzycy oraz mikro-kwasów rybonukleinowych. Ten fragment rozprawy świadczy o dobrej znajomości tematu przez Doktorantkę, która trafnie identyfikuje luki w aktualnym stanie wiedzy, uzasadniając podjęcie tematu badawczego.

Bibliografia, w liczbie 102 pozycji, jest aktualna, starannie dobrana i odnosi się bezpośrednio do poruszanej w rozprawie problematyki. Jej rozszerzeniem jest piśmiennictwo cytowane w poszczególnych publikacjach składających się na cykl prac.

Założenia i cele pracy zostały sformułowane jednoznacznie. Za główny cel badawczy Doktorantka przyjęła ocenę cząsteczek mikroRNA w kontekście reaktywności płytek krwi u pacjentów z cukrzycą t.2 celem wyodrębnienia nowych markerów aktywacji płytek krwi. Podstawowym celem części badawczej było wyselekcjonowanie nowych mikroRNA związanych z reaktywnością płytek oraz określenie związku wybranych mikroRNA a śmiertelnością w obserwacji długoterminowej. Drugim celem było określenie zdolności wyselekcjonowanych mikroRNA do monitorowania odpowiedzi na leczenie przeciwplatekowe u pacjentów z cukrzycą t.2.

Material objęty analizą w ramach rozprawy pochodzi z badania AVOCADO (*Aspirin Versus/Or Clopidogrel in Aspirinresistant Diabetics inflammation Outcomes Study*) przeprowadzonego w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz I Katedrze i Klinice Kardiologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Analiza mikroRNA została przeprowadzona w próbkach osocza pochodzących od pacjentów z cukrzycą t.2 włączonych uprzednio do badania AVOCADO. Po 6-letnim okresie obserwacji, uzyskano informacje odnośnie śmiertelności oraz hospitalizacji z przyczyn zakrzepowo-zatorowych. Pierwszorzędowy punkt końcowy został zdefiniowany jako zgon z dowolnej przyczyny. Drugorzędowym punktem końcowym określono sumę incydentów zdefiniowanych przez pierwszorzędowy punkt końcowy i zdarzeń zakrzepowo-zatorowych.

Metodyka została szczegółowo przedstawiona w poszczególnych publikacjach.

Metody statystyczne zostały dobrane prawidłowo.

Pierwsza praca wchodząca w skład rozprawy doktorskiej:

“The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review. Pordzik J, Piszczak K, De Rosa S, Jones AD, Eyileten C, Indolfi C, Malek L, Postula M. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Mar 20;9:74.” to doskonała praca przeglądowa mająca na celu ocenę potencjalnej roli mikroRNA związanych z płytkami krwi w rozwoju niekorzystnych zdarzeń sercowych w populacjach wysokiego ryzyka, w tym u chorych z cukrzycą. Publikację przygotowano na podstawie 103 pozycji literatury. Wśród nich jest aż 8 prac pochodzących z ośrodka macierzystego Promotora pracy Pana Profesora Marka Postuły, a w jednej z cytowanych prac lek. Justyna Pordzik jest drugim Autorem. Przegląd literatury w omawianej pracy jest niezwykle interesujący.

W publikacji podkreślono, że po aktywacji płytki krwi wydzielają mikropęcherzyki, które przenoszą duże ilości czynników wzrostu, a także różnych białek, które mogą wywierać

działanie pozakomórkowe. Ostatnie badania wykazały, że mikropecherzyki mogą dostarczać płytkowe mikroRNA do określonego miejsca w układzie krążenia. MikroRNA pochodzące z płytek krwi, które mają najwyższy związek z chorobami serca i naczyń to miR-223 i miR-126. MiR-223 jest powiązany z miażdżycą, podczas gdy miR-126 reguluje gen, który jest silnie powiązany z dysfunkcją śródbłonna. Co więcej, stwierdzono, że polimorfizmy genetyczne w obrębie genów związanych z reaktywnością płytek mogą być również użytecznym narzędziem prognostycznym.

Coraz więcej dowodów sugeruje, że płytkowe mikroRNA mogą być wykorzystywane jako biomarkery w chorobach zapalnych, w tym cukrzycy t.2. Biorąc pod uwagę znaczny wkład płytek w puli krążącego mikroRNA, płytki mogą służyć jako główne źródło tego rodzaju biomarkerów.

Druga praca wchodząca w skład cyklu:

“Significance of circulating microRNAs in diabetes mellitus type 2 and platelet reactivity: bioinformatic analysis and review. Pordzik J, Jakubik D, Jarosz-Popek J, Wicik Z, Eyileten C, De Rosa S, Indolfi C, Siller- Matula JM, Czajka P, Postuła M. Cardiovasc Diabetol. 2019 Aug 30;18(1):113.” miała na celu ocenę znaczenia krążących mikroRNA w cukrzycy typu 2 i reaktywności płytek krwi. Przegląd literatury przeprowadzono posługując się 88 pozycjami literatury, cytując także 4 prace z ośrodka macierzystego Prof. Marka Postuły w tym publikację, w której lek. Justyna Pordzik jest pierwszym autorem.

Według potwierdzonych danych zawartość mikroRNA w płytkach krwi, ich stabilność biochemiczna w płynach ustrojowych, a także specyficzność tkankowa wskazuje, że mogą stać się potężnymi, nieinwazyjnymi biomarkerami stosowanymi w cukrzycy t.2. i ocenie funkcji płytek krwi. MikroRNA wywierają swoje działanie jako delikatne modulatory ekspresji genów i działają w formie epigenetycznych sieci regulacyjnych.

Szczegółowa analiza sieci regulacyjnych ma istotne znaczenie kliniczne.

Dzięki zastosowaniu narzędzi analizy bioinformatycznej Doktorantka i współpracownicy przeprowadzili ocenę kluczowych funkcji biologicznych i ścieżek sygnalizacyjnych związanych z mikroRNA z najbardziej widocznym wzorcem ekspresji różnicowej w cukrzycy t.2 w porównaniu z grupą kontrolną. Stosując to podejście, Autorzy znaleźli 3 powszechne mikroRNA, a mianowicie miR-30a-5p, miR-30d-5p i miR-30c-5p, jako mikroRNA zaangażowane w krzepnięcie krwi, aktywację płytek krwi, metabolizm glukozy i stan zapalny, które wspólnie przyczyniają się do rozwoju powikłań sercowych u pacjentów z cukrzycą. Do tej pory przeprowadzono nieliczne badania powyższych mikroRNA w kontekście cukrzycy. Wykazano związek miR-30a-5p z metabolizmem glukozy oraz stwierdzono korelację

z markerami sercowymi, co sugeruje, że miR-30a-5p może mieć wartość prognostyczną w przewidywaniu cukrzycy i jej powikłań. Dodatkowo wyniki analizy bioinformatycznej pokazały, że *PRKARIA* może być jednym z najważniejszych genów w cukrzycy regulowanym przez mikroRNA. Gen *PRKARIA* koduje podjednostkę regulacyjną kinazy białkowej typu I-alfa. Kinaza białkowa A (PKA) to enzym, który wspomaga wzrost i podział komórek. Wykazano wpływ *PRKARIA* na regulację wydzielania insuliny za pośrednictwem PKA.

Trzecia publikacja to praca oryginalna:

“MiR-126 is an independent predictor of long-term all-cause mortality in patients with type 2 diabetes mellitus. Pordzik J, Eyileten-Postuła C, Jakubik D, Czajka P, Nowak A, De Rosa S, Gąsecka A, Cieślicka-Kapłon A, Sulikowski P, Filipiak KJ, Mirowska-Guzel D, Siller-Matula JM, Postuła M. Front Endocrinol (Lausanne). 2018 Mar 20;9:74.”

Do badania włączono 152 pacjentów z cukrzycą. Wśród włączonych pacjentów 10,3% pacjentów zmarło w czasie obserwacji 5,9-letniej. Pacjenci otrzymywali albo kwas acetylosalicylowy (ASA) 75 mg, ASA 150 mg lub kłopidogrel. Po włączeniu wszystkich mikroRNA do jednego wielowymiarowego modelu regresji Coxa, tylko miR-126 był predykcyjny względem przyszłego wystąpienia zgonu z jakiegokolwiek przyczyny. Ponadto wykazano istotnie wyższą ekspresję miR-126, miR-223 i Let-7e u pacjentów leczonych kłopidogrelem w porównaniu z pacjentami leczonymi ASA.

Doktorantka wskazuje, że istnieją ekscytujące możliwości dalszego poszukiwania płytkowych miRNA miR-126, miR-223 i Let-7 do monitorowania i optymalizacji leczenia przeciwplatekowego. Oporność na ASA i oporność na kłopidogrel były ostatnio przedmiotem intensywnych badań. Ograniczeniem badań nad reaktywnością płytek krwi i wyników klinicznych jest to, że przeprowadzono je u pacjentów bezpośrednio po przebytych incydencie zakrzepowo-zatorowym. Jest zatem prawdopodobne, że wysoka reaktywność płytek krwi mogła wynikać z hiperreaktywności płytek związanej z chorobą zakrzepowo-zatorową. Wyniki przedstawione przez Doktorantkę potwierdzają wcześniejsze ustalenia dotyczące potencjału prognostycznego mikroRNA pochodzenia płytkowego w cukrzycy oraz dostarczają nowych informacji. Przewaga antagonistów P2Y12 w porównaniu z ASA zasługuje na dalsze badania i jest zgodna z najnowszymi badaniami klinicznymi dotyczącymi wczesnego przerywania ASA u pacjentów leczonych podwójną terapią przeciwplatekową. W ostatnich latach nastąpił rozwój technik, który pozwala stworzyć liczne modele poświęcone badaniu mikroRNA w kontekście reaktywności płytek krwi. Zamiast skupiać się

na pojedynczych mikroRNA, zintegrowane podejście powinno uwzględniać ekspresję wielu mikroRNA, które odzwierciedlają złożoność regulacji homeostazy w cukrzycy. Wyniki omawianych badań pokazują obiecującą rolę mikroRNA zarówno w zastosowaniu diagnostycznym i terapeutycznym w cukrzycy oraz nadają kierunek kolejnym badaniom naukowym z wykorzystaniem mikroRNA. Dyskusja w pracy jest bardzo ciekawa i opiera się na 64 pozycjach literatury. Rozdział o ograniczeniach badania świadczy o głębokim przemyśleniu analizowanego materiału.

Przy okazji chciałabym zadać Doktorantce 3 pytania:

1. **Z czego mogą wynikać różnice w znaczeniu rokowniczym miR-126 u pacjentów z różnymi postaciami choroby wieńcowej?**
2. **Czy takie różnice występują też w różnych postaciach cukrzycy ?**
3. **Czy na mikroRNA ma wpływ stężenie HbA1c lub też czas trwania cukrzycy ?**

Podsumowanie przedstawia najważniejsze wyniki badań, odnosząc je do rzeczywistości klinicznej i danych literaturowych. Wnioski zostały przedstawione w sposób przejrzysty i nawiązujący do sformułowanych wcześniej celów rozprawy doktorskiej.

Streszczenia w języku polskim i angielskim prawidłowo podsumowują najważniejsze wyniki badań i wnioski całej rozprawy.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi oryginalne dokonanie Doktorantki i świadczy o jej niezwyklej dojrzałości naukowej i klinicznej oraz o znakomitym opanowaniu warsztatu pracy naukowej. Chciałabym podkreślić, że uzyskane wyniki stanowią niezwykle cenne źródło wiedzy dotyczące omawianego tematu. Chcę podkreślić, że badania obejmują pacjentów najwyższego ryzyka powikłań ze strony serca. W ich przypadku każda poprawa diagnostyki czy terapii ma kolosalne znaczenie.

Rozprawa doktorska bez wątpienia **spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668)”**. Mam zaszczyt i przyjemność zwrócić się do **Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego** z prośbą o dopuszczenie lek. Justyny Pordzik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. **Ponadto z wielką przyjemnością wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

Anna Tomaszuk-Kazberuk
 7472400
 Prof. dr hab. n. med.
 Anna Tomaszuk-Kazberuk
 KARDIOLOG, internista
 15-548 Białystok ul. Złotowa 27A