



Poznań, dn. 15.01.2024 r.

### RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr. Mateusza Sikory pt.: „Rola i znaczenie małych niekodujących cząsteczek RNA w przebiegu regeneracji tkanki kostnej o znamionach osteoporozy starczej na przykładzie miRNA-21-5p”.

**Promotor: dr hab. Krzysztof Marycza**

**Promotor pomocniczy: dr hab. Agnieszka Śmieszek**

Praca została zrealizowana w Katedrze Biologii Eksperymentalnej, Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Osteoporoza to choroba, która dotyka układ szkieletowy człowieka. W przebiegu tej choroby dochodzi do zmniejszenia gęstości kości, co zwiększa podatnością na złamania nawet przy niewielkich obciążeniach. Ze względu na etiologie możemy wyróżnić osteoporozę pierwotną oraz wtórną. Osteoporoza pierwotna obejmuje osteoporozę młodzieńczą, postmenopauzalną oraz starczą. Osteoporoza starcza jest bardzo istotnym problemem zdrowotnym na świecie. Uważa się, że rozwój osteoporozy starczej jest wynikiem zaburzenia homeostazy immunometabolicznej, która odpowiada za przebudowę tkanki kostnej. Aktywnością osteoblastów oraz osteoklastów kontroluje prawidłową gęstości tkanki kostnej. Utrata równowagi pomiędzy resorpcją tkanki kostnej a jej odbudową jest wynikiem osłabienia aktywności osteoblastów w porównaniu do aktywności osteoklastów, co prowadzi do zmniejszenia gęstości kostnej oraz wzrostu ryzyka złamań. Prawidłowa funkcja osteoblastów oraz osteoklastów jest regulowana przez szereg hormonów, cytokin oraz czynników wzrostowych. Kluczowym szlakiem molekularnym regulującym równowagę pomiędzy osteoblastami a osteoklastami jest szlak sygnałowy RANKL/OPG/RANK. RANKL oraz

osteoprotegeryna (OPG) są uwalniane przez osteoblasty, RANKL wiąże się ze swoistym receptorem osteoklastów i regulują ich dojrzewaniem oraz aktywacją. Natomiast OPG hamuje wiązanie się RANKL do receptora osteoklastów.

Najnowsze badania sugerują, że cząsteczki RNA niekodujące białka, głównie miRNAs (mikroRNAs), mogą być potencjalnymi regulatorami aktywności osteoblastów oraz osteoklastów. MiRNA oraz inne cząsteczki RNA niekodujące białka mogą kontrolować postranskrypcyjną ekspresję genów, oraz wpływać na metabolizm komórek progenitorowych. MiRNA jest jednoniciową cząsteczką RNA o długości od 19 do 25 nukleotydów, regulującą ekspresję innych genów poprzez oddziaływanie z mRNA, zwykle w rejonie 3'UTR.

Duże nadzieje w terapii oraz regeneracji złamań tkanki kostnej towarzyszącej osteoporozie starczej wiąże się z komórkami progenitorowymi pochodzącymi ze szpiku kostnego BMSCs (ang. bone marrow stem/stromal cells). BMSCs w warunkach *in vitro* mogą się różnicować w kierunku tkanki kostnej, chrzęstnej lub tłuszczowej. BMSCs wykazują ekspresję cząsteczek oraz białek aktywujących podstawowe szlaki molekularne powiązane z regeneracją tkanki kostnej. Wysokie możliwości regeneracyjne BMSCs klasyfikują te komórki do potencjalnych narzędzi klinicznych w leczeniu złamań tkanki kostnej.

W ostatnich latach zaobserwowano, że potencjał kliniczny BMSCs w regeneracji tkanki kostnej jest powiązany z sekrecją przez te komórki mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych zawierających liczne niekodujące cząsteczki RNA oraz czynniki wzrostowe. MiRNA znajdujący się w mikropęcherzykach uwalnianych z BMSCs może wpływać na aktywność osteoblastów, osteoklastów oraz regenerację tkanki kostnej. Niekodujące cząsteczki RNA regulują szereg szlaków molekularnych poprzez kontrole translacji cząsteczek mRNA w mechanizmie miRNA-LncRNA-mRNA. MiRNA uwalniany z BMSCs może wpływać na różnicowanie, aktywność oraz przeżycie komórek tkanki kostnej i ostatecznie jej przebudowę. BMSCs uzyskane od osób ze starczą osteoporozą charakteryzują się obniżoną aktywnością proliferacyjną, żywotnością, obecnością markerów stresu oksydacyjnego oraz ograniczoną ekspresją genów powiązanych z regeneracją tkanki kostnej. MiRNA jest również uwalniany do krwioobiegu gdzie występuje w egzosomach związany z białkami AGO, z HDL lub związany w ciałkach apoptotycznych. Cząsteczki miRNA znajdujące się w krwioobiegu mogą być nowymi markerami molekularnymi szeregu chorób, również chorób tkanki kostnej.

W ostatnich latach pośród wielu cząsteczek miRNA zidentyfikowano cząsteczkę miRNA-21-5p biorącą udział w regulacji przebudowy tkanki kostnej. Między innymi wykazano, że miRNA-21-5p reguluje ekspresją cząsteczki Smad7, która z kolei kontroluje

szlak sygnałowy indukowany przez transformujący czynnik wzrostu TGF- $\beta$ . MiRNA-21-5p kontroluje również ekspresję szeregu genów w komórkach progenitorowych szpiku kostnego, osteoblastach a także ma wpływ na różnicowanie oraz przeżywalność osteoklastów.

Pomimo wielu badań mających na celu określenie roli miRNA w aktywacji komórek progenitorowych oraz regeneracji tkanki kostnej, istnieje wiele niejasności dotyczących roli miRNA w zaburzeniu homeostazy tkanki kostnej u osób z osteoporozą starczą. Odkrycie roli miRNA w regeneracji tkanki kostnej nakreśla kolejne zadania badawcze. Szczególnie wyjaśnienia wymaga rola miRNA w regulacji translacji mRNA kodującego markery regeneracji tkanki kostnej. Uzyskane wyniki pozwolą pogłębić naszą wiedzę dotyczącą zaburzeń funkcjonowania komórek kostnych oraz komórek progenitorowych w osteoporozie starczej.

Rozprawa doktorska mgr. Mateusza Sikora podejmuje próbę wyjaśnienia roli miRNA-21-5p w szlakach molekularnych powiązanych z możliwościami regeneracyjnymi komórek progenitorowych o fenotypie osteoporozy starczej. Doktorat w badaniach swoich wykorzystał model myszy osteoporotycznych szczepu SAMP6 oraz wyizolowane ze szpiku tych myszy komórki progenitorowe BMSCs. Badania były również prowadzone na modelowych liniach komórkowych MC3T3-E1 (mysie preosteoblasty) oraz 4B12 (mysie preosteoklasty). Poznanie molekularnych mechanizmów warunkujących przebudowę osteoporetycznej tkanki kostnej będzie miało ogromny wpływ na opracowanie nowych terapii oraz nowej generacji leków w leczeniu osteoporozy starczej.

### **Ocena rozprawy doktorskiej.**

Rozprawa doktorska mgr. Mateusza Sikora została przygotowana jako cykl 4 publikacji, pracy przeglądowej i 3 prac oryginalnych. Należy podkreślić, że wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) i wysokiej wartości punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN). Łączna wartość IF tych prac wyniosła 28,28 co odpowiada łącznej wartości punktów MNiSW=480. Praca przeglądowa została opublikowana w 2020 r. w czasopiśmie Mol Ther Nucleic Acids (IF=8,886; MEiN=140). Prace oryginalne zostały opublikowane w latach 2020 r.-2023 r. w czasopiśmie Cells (IF=6,6; MEiN=140), Journal of Cellular and Molecular Medicine (IF=5,295; MEiN=100) oraz Stem Cell Res Ther (IF=7,5; MEiN=100).

W trzech publikacjach wchodzących w skład cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską mgr Mateusz Sikora jest pierwszym autorem, co świadczy o dużym zaangażowaniu i samodzielności doktoranta.

Celem rozprawy doktorskiej było wyjaśnienie roli miRNA-21-5p w regeneracji tkanki kostnej dotkniętej osteoporozą starczą. Doktorant postanowił ocenić wpływ miRNA-21-5p na aktywność metaboliczną, proliferacyjną oraz regeneracyjną komórek progenitorowych BMSCs, oraz komórek MC3T3-E1 i 4B12. Zbadano również nowe szlaki molekularne z uwzględnieniem regulacji epigenetycznej translacji miRNA-LncRNA-mRNA. Szczególną uwagę poświęcono szlakom RANKL/OPG/RANK oraz RUNX-2/TRAP.

Pan mgr Mateusz Sikora osiągnął założone cele badań, wywiązał się całkowicie z zadań, jakie zostały postawione w celu pracy.

Wykorzystując linię komórkową MC3T3-E1 wykazał, że miR-21-5p aktywuje preosteoblasty zwiększa ekspresję cząsteczek OPG, RANKL, RUNX-2, OCL, OPN, COLL-1 oraz nasila mineralizację macierzy zewnątrzkomórkowej nowej tkanki kostnej. Z kolei ekspresja cząsteczek OPG oraz RANKL stymulowała preosteoklasty 4B12 oraz ekspresję genów powiązanych z osteolizą: TRAP, CTSK, CAIL i MMP-9.

Doktorant scharakteryzował komórki BMSCs uzyskane od osteoporotycznego szczepu myszy SAM/P6. Wykazał, że komórki te zawierają fenotyp starczy i mogą stanowić model dla badań podłoża molekularnego osteoporozy starczej, jak również mogą posłużyć jako model do projektowania nowych metod diagnostycznych, a nawet terapii celowanych. W badaniach z komórkami BMSCs izolowanymi od osteoporotycznego szczepu myszy SAM/P6 doktorant wykazał, że ekspresja miRNA-21-5p przywraca ich potencjał regeneracyjny. BMSCs poddane działaniu miRNA-21-5p odzyskały zdolność tworzenia wysoko zmineralizowanej macierzy zewnątrz komórkowej w warunkach *ex vivo* oraz *in vivo*.

Podsumowując, uzyskane wyniki mgr. Mateusza Sikory sugerują, że dostarczenie cząsteczki miRNA-21-5p do tkanki kostnej ze starczą osteoporozą, może stanowić element leczenia tej choroby.

Dążąc do osiągnięcia założonych celów, doktorant zastosował wiele nowoczesnych narzędzi badawczych biologii molekularnej, bardzo dobrze dobranych i dostosowanych na potrzeby badań własnych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zawiera oryginalne i wartościowe wyniki, które zostały opublikowane w artykułach będących podstawą rozprawy doktorskiej.

Pan mgr Mateusz Sikora opanował bardzo nowoczesny warsztat pracy, który między innymi obejmował prace na mysim modelu starczej osteoporozy, hodowle komórek *in vitro*,

transfekcje komórek, cytometrie przepływową, mikroskopię konfokalną western blott oraz cały szereg innych technik badawczych.

Pan mgr Mateusz Sikora ma dużą wiedzę teoretyczną, jest dojrzałym naukowcem, o czym świadczą wnikliwe oraz twórcze dyskusje znajdujące się w publikacjach wchodzących w skład cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma również dużą wartość aplikacyjną wskazuje miRNA-21-5p jako potencjalną cząsteczkę zdolną przywrócić prawidłową regenerację tkanki kostnej. Uzyskane wyniki mogą pomóc w opracowaniu nowoczesnych terapii osteoporozy starczej polegającej na dostarczeniu cząsteczki miR-21-5p do komórek progenitorowych. Pozwoliłoby to przywrócić prawidłową funkcję osteoblastów i osteoklastów stanowiąc element leczenia osteoporozy starczej.

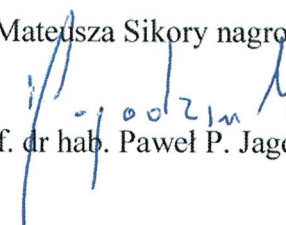
W trakcie czytania pracy nasuwają się drobne uwagi.

W rozdziale „Cel pracy” jest brak uwzględnienia linii modelowych MC3T3-E1 i 4B12 w badaniach. Wspominając o modelach badawczych, doktorant mógłby również wspomnieć o tych liniach modelowych w rozdziale „Wstęp”. Czytając rozprawę doktorską, można zauważyć drobne błędy interpunkcyjne. Praca doktorska jest jednak napisana bardzo dobrze, a drobne błędy interpunkcyjne w żaden sposób nie umniejszają jej wyjątkowej wartości.

**Rozprawa doktorska mgr. Mateusza Sikory jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.**

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr. Mateusza Sikory zatytułowana „Rola i znaczenie małych niekodujących cząsteczek RNA w przebiegu regeneracji tkanki kostnej o znamionach osteoporozy starczej na przykładzie miRNA-21-5p”, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023, poz. 742 ze zm.) i wnoszę o dopuszczenie mgr Mateusz Sikory do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową przeprowadzonych badań oraz dorobek naukowy autora, wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr Mateusza Sikory nagrodą.

  
Prof. dr hab. Paweł P. Jagodziński