

Prof. dr hab. Andrzej Tretyn

11.01.2024

Instytut Biologii

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Mateusza Sikory

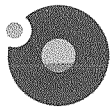
pt. „Rola i znaczenie małych niekodujących cząsteczek RNA w przebiegu regeneracji tkanki kostnej o znamionach osteoporozy starczej na przykładzie miRNA-21-5p”

wykonanej pod kierunkiem prof. dra hab. Krzysztofa Marycza oraz dr hab. Agnieszki Śmieszek

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl czterech publikacji naukowych (jednej pracy przeglądowej oraz trzech oryginalnych artykułów), opublikowanych w latach 2020-2023 w zagranicznych czasopismach naukowych ujętych w zbiorach Journal Citation Report. W skład cyklu wchodzi:

1. **Sikora M**, Marycz K, Śmieszek A: Small and long non-coding RNAs as functional regulators of bone homeostasis, acting alone or cooperatively. *Mol Ther Nucleic Acids* 2020, 21:792-803; **IF=8.888, MEiN=140, cytowanie wg WoS=19**,
2. Śmieszek A, Marcinkowska K, Pielok A, **Sikora M**, Valihrach L, Marycz K: The role of miR-21 in osteoblasts-osteoclasts coupling in vitro. *Cells* 2020, 9(2); **IF=6.6, MEiN=140, cytowanie wg WoS=40**,
3. **Sikora M**, Śmieszek A, Marycz K: Bone marrow stromal cells (BMSCs CD45⁻/CD44⁺/CD73⁺/CD90⁺) isolated from osteoporotic mice SAM/P6 as a novel model for osteoporosis investigation. *J Cell Mol Med* 2021, 25(14):6634-6651; **IF=5.295, MEiN=100, cytowanie wg WoS=12**,
4. **Sikora M**, Śmieszek A, Pielok A, Marycz K: MiR-21-5p regulates the dynamic of mitochondria network and rejuvenates the senile phenotype of bone marrow stromal cells (BMSCs) isolated from osteoporotic SAM/P6 mice. *Stem Cell Res Ther* 2023, 14(1):54; **IF=7.5, MEiN=100, cytowanie wg WoS=3**.

Sumaryczny wskaźnik cytowań (Impact Factor; IF) czterech wyżej wymienionych publikacji wynosi 28.28. Naukowa, sumaryczna „wartość” czasopism przyjęta przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSzW) wynosi 480 punktów (140+140+100+100). Natomiast w oparciu o bazę Scopus (wg wskaźnika bibliometrycznego nazywanego CiteScore; CS) wszystkie te czasopisma znajdują się w pierwszym kwartylu (Q1) wykazu, z czego dwa; *Molecular Therapy - Nucleic Acids* (Cell Press) to 9-te (na 156 klasyfikowanych) najlepsze czasopismo z zakresu „drug discovery” natomiast *Stem Cell Research and Therapy* (Springer Nature) to 3-cie najlepsze czasopismo z zakresu biochemii, genetyki i biologii molekularnej (na 79 klasyfikowanych). Na podstawie rangi czasopism, w których ukazały się prace wchodzące w skład ocenianej rozprawy doktorskiej można przewidywać, że dotychczasowa (licząca 74 odwołania) liczba cytowań będzie systematycznie i szybko rosnąć.



Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Mgr Mateusz Sikora, w swojej rozprawie doktorskiej, skoncentrował się na wyjaśnieniu roli małych i długich RNA niekodujących w regulacji homeostazy kostnej. Jego prace, obejmujące cztery publikacje, prezentują szeroki zakres badań nad molekularnymi mechanizmami związanych z osteogenezą i osteoporozą. Autor szczegółowo analizuje mikroRNA (miRNA) i długie niekodujące RNA (lncRNA), prezentując ich interakcje oraz wpływ na procesy różnicowania komórek i homeostazę tkanki kostnej.

W pierwszej publikacji, „*Small and long non-coding RNAs as functional regulators of bone homeostasis, acting alone or cooperatively*” opisano funkcje miRNA i lncRNA w metabolizmie kostnym. Wskazano na znaczenie tych molekuł jako potencjalnych biomarkerów i terapeutycznych celów w schorzeniach kostnych. Podkreślono znaczenie technologii sekwencjonowania RNA, zwłaszcza NGS (next-generation sequencing), w badaniach nad siecią miRNA-lncRNA-mRNA. Praca ta ukazuje kompleksowość regulacji genów niekodujących białka oraz potencjalne korzyści wynikające z lepszego zrozumienia patogenezy chorób kostnych.

W publikacji „*The Role of miR-21 in osteoblasts-osteoclasts coupling in vitro*” skoncentrowano się na badaniu roli miR-21 w homeostazie tkanki kostnej, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu jego hamowania na różnicowanie się komórek pre-osteoblastycznych i sygnalizację parakrynną do pre-osteoklastów. Wykazano, że inhibicja miR-21 wpływa na ekspresję genów kodujących markery osteogenezy, a także na syntezę białka OPN, istotnego dla mineralizacji macierzy pozakomórkowej. Autorzy tej pracy wnioskują, że miR-21 reguluje ekspresję czynników ważnych dla przeżycia pre-osteoklastów, takich jak RANKL, co wpływa na proces różnicowania się osteoklastów.

W trzeciej publikacji cyklu zatytułowanej „*Bone marrow stromal cells (BMSCs CD45⁻/CD44⁺/CD73⁺/CD90⁺) isolated from osteoporotic mice SAM/P6 as a novel model for osteoporosis investigation*” przedstawiono nowatorski model do badania osteoporozowego środowiska *in vitro*, wykorzystując komórki progenitorowe (BMSCs) izolowane z szpiku kostnego myszy z osteoporozą. Autorzy porównali te komórki z komórkami BMSCs od zdrowych myszy i wykazali, że BMSCs z myszy osteoporotycznych posiadają zmienioną morfologię, obniżoną metaboliczną aktywność i zwiększoną apoptozę. Na podstawie analizy transkryptomu wykazano obniżoną ekspresję genów kluczowych dla osteogenezy. Na tej podstawie zasugerowano, że BMSCs z myszy osteoporotycznych mogą stanowić odpowiedni model do badań *in vitro* nad osteoporozą.

W publikacji „*MiR-21-5p regulates the dynamic of mitochondria network and rejuvenates the senile phenotype of bone marrow stromal cells (BMSCs) isolated from osteoporotic SAM/P6 mice*” skupiono się na roli miR-21-5p w regulacji dynamicznej sieci mitochondriów i przywracaniu fenotypu komórek progenitorowych szpiku kostnego (BMSCs) u myszy z osteoporozą. Autorzy wykazali, że upregulacja miR-21 poprawia żywotność komórek i reguluje dynamikę mitochondriów, jednocześnie stymulując różnicowanie osteogeniczne BMSCs. Badania *in vivo* potwierdzono, że miR-21-5p może być obiecującą molekularną strategią dla diagnostyki i leczenia osteoporozy senilnych.

Wszystkie wymienione powyżej prace zostały starannie napisane, a wyniki badań zaprezentowano w sposób zrozumiały i logiczny. Wnoszą one istotny wkład w lepsze poznanie procesu regeneracji tkanki kostnej, szczególnie w kontekście osteoporozy starczej.

Warto nadmienić, że mgr Mateusz Sikora wzbogacił swoje osiągnięcia naukowe o znaczącym dorobek poza ramami przedstawionego cyklu publikacji. Jest on współautorem 11 punktowanych artykułów naukowych oraz ośmiu doniesień konferencyjnych co potwierdza Jego aktywny udział w dyskusji naukowej oraz zdolność prezentacji wyników swoich badań na



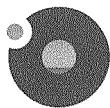
forum naukowym. Dodatkowo, brał udział w 3 kursach i szkoleniach czym potwierdza chęć do systematycznego doskonalenia swoich umiejętności oraz poszerzania zakresu wiedzy. Aktywność w ramach 9 projektów, zarówno jako stypendysta, stażysta, jak również kierownik (w 2 projektach dla doktorantów), podkreśla zdolności organizacyjne i umiejętność efektywnego współpracowania w zespole badawczym. Biorąc pod uwagę różnorodność ról, w jakich brał udział, można uznać, że autor skutecznie integruje swoje umiejętności badawcze z praktycznym doświadczeniem zarządzania projektami naukowymi. Ten dodatkowy dorobek naukowy poszerza perspektywę oceny, wskazując na wszechstronność i zaangażowanie autora nie tylko w prowadzenie badań podstawowych, ale także w rozwijanie umiejętności zarządzania, prezentacji oraz stałego doskonalenia się w obszarze naukowym.

Zasadność podjętej tematyki

Osteoporoza jest chorobą metaboliczną układu kostnego, charakteryzującą się utratą masy kostnej oraz zmniejszeniem gęstości mineralnej kości. Stanowi poważny problem zdrowotny, zwłaszcza wśród osób starszych, ponieważ zwiększa ryzyko złamań kości i utrudnia utrzymanie prawidłowej sprawności fizycznej. Z czasem staje się coraz bardziej powszechna w społeczeństwach starzejących się, co podkreśla pilność badań nad mechanizmami leżącymi u podstaw tej choroby. Osteoporoza wpływa negatywnie na jakość życia pacjentów i generuje znaczne koszty społeczne i ekonomiczne związane z leczeniem złamań oraz długotrwałą rehabilitacją.

W kontekście osteoporozy istnieją przekonującą świadczące o genetycznych predyspozycjach do rozwoju tej choroby. Badania genetyczne wskazują, że istnieją geny związane z metabolizmem kostnym, które mogą wpływać na ryzyko osteoporozy. Identyfikacja tych genów jest kluczowa dla zrozumienia molekularnego podłoża tej choroby i rozwijania bardziej ukierunkowanych terapii. Skoncentrowanie się na mikroskalowym poziomie regulacji genów, jakim są małe niekodujące cząsteczki RNA, otwiera nowe perspektywy dla zidentyfikowania kluczowych mechanizmów kontrolujących homeostazę kostną. MiRNA-21-5p jako centralny punkt rozważań w rozprawie odgrywa kluczową rolę w regulacji procesów komórkowych związanych z homeostazą kostną. W związku z tym, zrozumienie funkcji tego konkretnego miRNA może prowadzić do identyfikacji potencjalnych celów terapeutycznych i strategii leczenia dla osób dotkniętych osteoporozą starczą. Małe niekodujące cząsteczki RNA, takie jak miRNA-21-5p, mają zdolność wpływania na ekspresję genów, regulację procesów różnicowania komórkowego, a także modulację interakcji między osteoblastami a osteoklastami. Ponadto, zrozumienie roli miRNA-21-5p w dynamicznej sieci mitochondriów oraz w odmładzaniu fenotypu komórek szpiku kostnego, szczególnie w kontekście osteoporozytycznych zmian, jest kluczowe dla opracowania strategii leczenia skierowanych na przywracanie normalnej funkcji komórek kostnych u osób starszych.

Rozprawa mgr Mateusza Sikory, skupiająca się na roli małych niekodujących cząsteczek RNA w regeneracji tkanki kostnej dotkniętej osteoporozą starczą, wnosi istotne informacje do obszarów badań naukowych wymagających uwagi. W szczególności, analiza miRNA-21-5p oraz wpływu tej cząsteczki na procesy komórkowe i dynamiczną sieć mitochondriów w kontekście osteoporozytycznych zmian stanowi nowatorskie podejście. Zasadność podjętej tematyki jest niepodważalna, a temat regeneracji tkanki kostnej w kontekście osteoporozy starczej jest szczególnie istotny, zważywszy na rosnącą liczbę osób dotkniętych tym schorzeniem. Wybór małych niekodujących cząsteczek RNA, zwłaszcza miRNA-21-5p, dodatkowo podkreśla innowacyjny charakter pracy. Skupienie się na tym



konkretnym miRNA wydaje się być uzasadnione, biorąc pod uwagę jego znaczenie w regulacji procesów komórkowych, w tym procesów związanych z homeostazą kostną. Ważne jest również zrozumienie, jak małe niekodujące cząsteczki RNA wpływają na interakcje pomiędzy osteoblastami a osteoklastami, co może mieć kluczowe znaczenie dla rozwoju terapii mających na celu przywrócenie równowagi homeostatycznej w układzie kostnym. Wprowadzenie innowacyjnych metod leczenia opartych na tej wiedzy mogłoby przyczynić się do poprawy jakości życia osób dotkniętych tym schorzeniem, a także znacząco zmniejszyć społeczne i ekonomiczne obciążenie związane z osteoporozą starczą.

Formalna charakterystyka pracy

Rozprawa doktorska mgr Mateusza Sikory stanowi wartościowe i kompleksowe opracowanie tematu związanego z rolą małych niekodujących cząsteczek RNA w procesie regeneracji tkanki kostnej z zaznaczeniem zmian osteoporotycznych. Autoreferat została starannie ustrukturyzowany, zaczynając od wykazu publikacji, których współautorem jest Doktorant i które wchodzi w skład rozprawy. Wybór odpowiednich czasopism o wysokim IF oraz zasięgu międzynarodowym dodaje wiarygodności i wartości przedstawionemu dorobkowi naukowemu. **Streszczenie** pracy w języku polskim i angielskim jest klarowne, precyzyjne i zwięzłe, umożliwiając czytelnikowi szybkie zrozumienie istoty tematu oraz zakresu badań zawartych w rozprawie. **Wstęp**, o długości 6 stron, wyznacza ramy dla dalszej analizy, prezentując czytelnikowi kontekst badawczy i ważność tematu oraz wskazując na luki w dotychczasowej wiedzy naukowej. **Cel ogólny** oraz siedem szczegółowych celów pracy są jasno określone, co pozwala na jednoznaczne zrozumienie kierunku badań oraz oczekiwanych rezultatów. **Materiały i metody** zostały szczegółowo opisane, obejmując różnorodne techniki, od hodowli komórkowych, poprzez transfekcję, aż po analizę *in vivo*. Szczególna uwaga została poświęcona analizom mikroskopowym oraz analizie ekspresji genów związanych z homeostazą kostną. Badania prowadzone z użyciem modelowych linii komórkowych MC3T3-E1, 4B12 oraz BMSCs, a także unikatowego modelu myszy osteoporotycznych, świadczą o trafnym dobraniu modeli eksperymentalnych, co zwiększa znaczenie uzyskanych wyników. Przy zastosowaniu takiej różnorodności modeli eksperymentalnych, możliwe było przeprowadzenie bardziej kompleksowej analizy procesów zachodzących na poziomie komórkowym i molekularnym w kontekście osteoporotycznych zmian. Ważnym aspektem pracy jest uzyskanie zgody komisji etycznej na przeprowadzenie badań, co podkreśla przestrzeganie standardów etycznych i zgodność z zasadami dobrej praktyki naukowej. Standardowe **Wyniki i Dyskusję** Doktorant zastąpił komentarzami do poszczególnych publikacji, które są starannie opracowane, a analiza wyników podparta dokładnymi analizami statystycznymi. Podsumowanie, wnioski i literatura są spójne i logicznie ułożone, prezentując pełną syntezę uzyskanych wyników. Włączenie pełnych tekstów publikacji stanowiących rozprawę dodaje wartości pracy, umożliwiając czytelnikowi dokładne zapoznanie się z przeprowadzonymi badaniami oraz pełnym kontekstem naukowym. Pracę uzupełniają oświadczenia Doktoranta dotyczące udziału w powstaniu poszczególnych publikacji wchodzących w skład cyklu, potwierdzone przez Promotora.

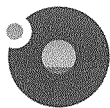
Cel szczegółowy nr 1, dotyczący poszukiwań małych cząsteczek RNA zaangażowanych w homeostazę i regulację metabolizmu w tkance kostnej, z perspektywy metod badawczych, wymagałby zastosowania systematycznego przeglądu literatury oraz analizy wyników „skriningu laboratoryjnego”. Takie badania przesiewowe mogłyby objąć analizę ekspresji genów, analizy ilościowe miRNA, a także ocenę ich funkcji w kontekście homeostazy kostnej.



Dodatkowo, istotne byłoby uwzględnienie wyników eksperymentów *in vivo*, które pozwoliłyby ocenić wpływ identyfikowanych miRNA na regulację homeostazy tkanki kostnej. Jednakże, po analizie treści pracy, można zauważyć, że ten konkretny cel nie został w pełni zrealizowany, ponieważ w ocenianej rozprawie doktorskiej, niestety, brak jest konkretnych informacji na temat przeprowadzenia takich (lub zbliżonych) badań, a także ich wyników. Jedynie w pracy przeglądowej wspomniano o kilku „osteomiRach”, takich jak miR-30, miR-124, miR-204. W dodatku, we **Wnioskach** z pracy nie odniesiono się do tego konkretnego celu, co stanowi zauważalny brak w zrealizowanych badaniach. W związku z tym, wydaje się, że cel ten nie został zrealizowany w dostateczny sposób. Brak konkretnych badań i analiz dotyczących innych miRNA, a także brak odniesienia do tego celu w Wnioskach, pozostawia lukę w kontekście osiągnięcia tego konkretnego celu. Warto również zaznaczyć, że nie zostało wyjaśnione w wystarczającym stopniu, dlaczego miR-21-5p znalazł się w centrum zainteresowań naukowych Doktoranta, pomimo istnienia innych potencjalnych markerów terapeutycznych. Silne uzasadnienie wyboru tej cząsteczki byłoby kluczowe dla pełnego zrozumienia logicznego przebiegu badań i decyzji badawczych.

Oświadczenia Doktoranta dotyczące jego wkładu w publikacje wzbudzają pewne wątpliwości, zwłaszcza w przypadku artykułu „The role of miR-21 in osteoblasts–osteoclasts coupling *in vitro*.” W Oświadczeniu, Doktorant wskazał na swój udział w "przeprowadzeniu analiz opartych o techniki biologii molekularnej, (...) wraz z ewaluacją i interpretacją uzyskanych wyników, a także pomoc w przygotowaniu manuskryptu". Niemniej jednak, w sekcji „Author Contributions” publikacji, jego nazwisko pojawiło się jedynie przy „resources,” co może budzić pewne nieścisłości co do jego konkretnego zaangażowania w różne etapy badania. Brak nazwiska Doktoranta przy deklaracji udziału dla zadań, takich jak: „investigation”, „formal analysis” czy „writing—original draft preparation”, pozostawia pytania dotyczące konkretnego wkładu Autora w opracowanie publikacji. Pomimo, że jest Mateusz Sikora wymieniony wśród autorów i ogólnie wspomniano o Jego roli, brakuje potwierdzenia szczegółowych informacji na temat jego konkretnego zaangażowania w te kluczowe aspekty projektu i powstania wspomnianej publikacji. Warto również zauważyć, że w pozostałych dwóch artykułach oryginalnych z cyklu, w publikacjach współautorzy zadeklarowali równorzędny wkład ("equal contribution"), co utrudnia jednoznaczne określenie wiodącej roli Doktoranta w ich powstaniu. Niemniej jednak Mateusz Sikora jest pierwszym autorem w trzech z czterech publikacji cyklu, aczkolwiek w żadnej z nich nie pełni roli autora korespondencyjnego. Aby wyjaśnić zakres zaangażowania, mogłoby być korzystne podanie w Oświadczeniach udziału procentowego Doktoranta w poszczególnych aspektach projektu, co pozwoliłoby na lepsze zrozumienie wkładu mgr Mateusza Sikory w badania, jak i opracowanie publikacji naukowych.

W pracy można dostrzec nieliczne błędy stylistyczne, językowe oraz literowe, obejmujące m.in. nieprecyzyjne sformułowania, nieścisłości gramatyczne i drobne literówki (np. „kosciotworzenie”, „komórki apoptotyczne”, „komórki stromlane”). Wiele skrótów wprowadzanych i wyjaśnianych jest stosowane zbyt często, co prowadzi do nadmiernego powtarzania terminologii. Przygotowany spis literatury jest niespójny (np. pozycja 2 jest nieprecyzyjna, nazwy czasopism są pisane pełną nazwą, jak i skrótową. W pozycji 47 załączono cytowanie pracy umieszczonej na serwerze bioRxiv (preprint), zamiast odwołania do dostępnej recenzowanej wersji ostatecznej (Carthew J, Donderwinkel I, Shrestha S, Truong VX, Forsythe JS, Frith JE: *In situ* miRNA delivery from a hydrogel promotes osteogenesis of encapsulated mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 2020, 101:249-261). Na stronie 16 brakuje cytowania dla informacji dotyczących opisanego eksperymentalnego modelu zwierzęcego, w którym chirurgicznie usuwa się jajniki. Ponadto zapis nazw genów nie jest jednorodny.



Podsumowanie

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr Mateusza Sikory reprezentuje spójny cykl czterech publikacji naukowych, które stanowią istotne wkłady w dziedzinę regeneracji tkanki kostnej, zwłaszcza w kontekście osteoporozy starczej. Praca ta znacząco przyczynia się do zrozumienia roli małych niekodujących cząsteczek RNA, ze szczególnym skoncentrowaniem się na miRNA-21-5p, w regulacji homeostazy kostnej i procesów regeneracyjnych. Wyniki uzyskane w ramach badań przedstawionych w rozprawie są niepodważalnie oryginalne i wartościowe. Autor skutecznie ukierunkował swoje badania na obszarze, który ma istotne znaczenie kliniczne, biorąc pod uwagę rosnącą liczbę osób dotkniętych osteoporozą. Badania prowadzone z wykorzystaniem różnorodnych modeli komórkowych oraz unikatowego modelu myszy osteoporotycznych dodają kompleksowości i rzetelności uzyskanym wynikom.

Należy docenić wysoki poziom merytoryczny oraz staranne wykonanie prezentowanych badań. Pomimo pewnych niedoskonałości w opisie, całość pracy pozostaje spójna tematycznie i przekonująca. Mateusz Sikora wykazał się głęboką wiedzą w dziedzinie regeneracji tkanki kostnej oraz umiejętnościami praktycznymi w prowadzeniu badań laboratoryjnych.

W świetle powyższego, rozprawa doktorska pt. „Rola i znaczenie małych niekodujących cząsteczek RNA w przebiegu regeneracji tkanki kostnej o znamionach osteoporozy starczej na przykładzie miRNA-21-5p” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 - 4 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 poz.1668 ze zm.). W związku z powyższym składam do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Mateusza Sikory do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Biorąc pod uwagę kompleksowość prowadzonych badań, obszerność i wartość merytoryczną uzyskanych wyników oraz wysokie wskaźniki naukometryczne publikacji wchodzących w skład osiągnięcia, uważam że rozprawa doktorska mgr Mateusza Sikory może być wyróżniona.

Andrzej Trebny