dr hab. Konrad Ocalewicz, prof. UG

Zakład Biologii i Ekologii Morza,

Wydział Oceanografii i Geografii,

Uniwersytet Gdański

Gdynia, 26.07.2022 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr. Macieja Florczyka pt. „MikroRNA i lncRNA jako biomarkery wpływu mikrocystyny-LR na wątrobę i mózg siei (*Coregonus lavaretus*)

Recenzowana praca dotyczy badania wpływu mikrocystyny-LR na ekspresję specyficznych dla wątroby i mózgu niekodujących cząsteczek RNA u siei. Wyniki badań będące najważniejszym elementem niniejszej rozprawy doktorskiej zostały zamieszczone w trzech współautorskich artykułach naukowych, które ukazały się w latach 2016-2021; **miR-122-5p as a plasma biomarker of liver injury in fish exposed to microcystin-LR** (Journal of Fish Diseases. 2016;39: 741-751) (Publikacja 1), **Microcystin-LR-triggered neuronal Toxicity in whitefish does not involve miR124-3p** (Neurotoxicity Research. 2019;35: 29-40) (Publikacja 2) i ***De novo* profiling of long non-coding RNAs involved in MC-LR-induced liver injury in whitefish: discovery and perspectives** (International Journal of Molecular Sciences. 2021;22:941) (Publikacja 3). Sumaryczna liczba punktów ministerialnych zgodnie z rokiem wydania publikacji wynosi 310, a Impact Factor 10,054. We wszystkich artykułach, Pan Maciej Florczyk jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym.

Recenzowana rozprawa doktorska składa się z dwóch części. W pierwszej z nich znajduje się spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz opis wyników pracy doktorskiej zawierający wprowadzenie do tematyki badań, cel badań, hipotezy badawcze, przedstawienie realizowanych zadań badawczych, wyniki weryfikacji hipotez zawierające najważniejsze rezultaty prowadzonych analiz oraz podsumowanie i główne wnioski. W tej części pracy znajdziemy także listę/spis metod stosowanych podczas prowadzonych badań oraz schemat przedstawiający sposób weryfikacji poszczególnych hipotez naukowych. Druga część pracy doktorskiej to kopie artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy oraz oświadczenia współautorów dotyczące ich udziału podczas realizacji badań i powstawania tych publikacji.

W pierwszej części rozprawy, doktorant w sposób przejrzysty i lakoniczny (w dobrym znaczeniu tego słowa), przedstawił aktualny stan wiedzy dotyczący produkcji toksyn z grupy mikrocystyn (hepatotoksyny) przez cyjanobakterie, molekularnej struktury mikrocystyn w tym także wariantu LR (MC-LR), konsekwencji narażenia na mikrocystyny obserwowanych

na poziomie organów (głównie wątroby i mózgu) i tkanek dziko-żyjących gatunków ryb oraz modelowych organizmów wykorzystywanych w badaniach toksykologicznych. W wyniku ekspozycji ssaków i ryb na działanie mikrocystyny-LR dochodzi min. do wzrostu ilości reaktywnych form tlenu wywołujących stres oksydacyjny, uszkodzenia retikulum endoplamzatycznego i cytoszkieletu komórek wątroby ryb, co w konsekwencji prowadzi do apoptozy i nekrozy hepatocytów. Dalej doktorant koncentruje się na opisie narzędzi diagnostycznych stosowanych w badaniach toksyczności mikrocystyn wskazując jednoznacznie na dużą potrzebę poszukiwania nowych biomarkerów oceny stanu wątroby i hepatocytów innych niż do tej pory stosowane markery histologiczne, których analiza wymaga ingerencji chirurgicznej. Nowoczesne podejście w diagnostyce usankcjonowane przez międzynarodowe gremia zajmujące się badaniami toksykologicznymi zaleca badanie molekularnych markerów w płynach ustrojowych zamiast stosowania oceny histopatologicznej, tak w badaniach medycznych jak i środowiskowych. Aktualnie w ocenie nieprawidłowości funkcjonowania wątroby bada się poziomy we krwi takich enzymów jak aminotransferaza alaninowa (ALT) i asparaginowa (AST). Wyniki badań dotyczących niekodującego RNA krążącego we krwi pokazują, że zarówno krótkie (mikro) jak i długie (lnc) niekodujące cząsteczki RNA, których związek ze stanem wątroby i mózgu potwierdzono u wybranych gatunków ssaków i ryb powinny być brane pod uwagę jako potencjalne biomarkery stanu fizjologicznego organizmu.

Z tych założeń wynika główny cel niniejszej rozprawy czyli **określenie możliwości wykorzystania wybranych mikroRNA jako biomarkerów uszkodzenia wątroby i mózgu ryb wywołanych mikrocystyną –LR oraz identyfikacja i charakterystyka lncRNA biorących udział w uszkodzeniu wątroby ryb**. Postawiono trzy hipotezy badawcze: uszkodzenia wątroby wywołane mikrocystyną-LR przyczynia się do wzrostu ilości krążących we krwi obwodowej mikroRNA, a szczególnie specyficznego i licznego w wątrobie miR122-5p (**Hipoteza 1**), uszkodzenie mózgu wywołane mikrocystyną-LR przyczynia się do wzrostu krążącego we krwi obwodowej specyficznego dla mózgu miR124-3p. Wzrost ekspresji miR124-3p we krwi i spadek w mózgu siei będzie negatywnie skorelowany ze zwiększoną ekspresją mRNA genu kodującego glejowe kwaśne białko włókienkowe GFAP co pokaże toksyczny efekt ekspozycji na mikrocystynę (**Hipoteza 2**) oraz **trzecia hipoteza** zakładająca, że ekspozycja siei na mikrocytynę-LR przyczynia się do zmian ekspresji długich niekodujących RNA mogących wpływać na przebieg toksycznego uszkodzenia wątroby.

Hipotezy weryfikowano eksperymentalnie realizując kolejne zadania badawcze, które zostały przedstawione na stronie piętnastej rozprawy, a szczegółowe wyniki badań zamieszczono w publikacjach składających się na pracę doktorską. Badania prowadzono na jednym gatunku ryb, siei (*Coregonus lavaretus*), dość powszechnie występującym w warmińsko-mazurskich i pomorskich rozległych jeziorach o chłodnej i dobrze natlenionej wodzie oraz w wodach Morza Bałtyckiego. W pracy nie znalazłem informacji dotyczących kryteriów jakimi kierował się doktorant wybierając właśnie ten gatunek do swoich badań. Szczegółowe informacje dotyczące założeń prowadzonych eksperymentów oraz metod badawczych wykorzystanych w trakcie ich realizacji są zawarte w artykułach naukowych, których zawartość w tej recenzji pozwalam sobie w sposób lakoniczny przedstawić.

Celem głównym badań, które opisano **w pierwszej publikacji** składającej się na niniejszą rozprawę doktorską była analiza ekspresji wybranych miRNA we krwi obwodowej siei po ekspozycji na mikrocystynę-LR (MC-LR). Doktorant analizował profile ekspresji czterech miRNA; miR-122-5p, letc-7c-7p, miR-148a-3p i miR-92a-3p po ekspozycji ryb na toksynę. Wybór badanych miRNA nie jest przypadkowy i został dokonany na podstawie opublikowanych w ostatnich latach wyników badań prowadzonych gównie na ssaczych i rybich modelach i dotyczących właśnie hepatotoksyczności mikrocystyn.

W części publikacji dotyczącej charakterystyki badanego materiału i metod, doktorant opisał szczegółowo część eksperymentalną, w tym warunki w jakich przebywały ryby podczas eksperymentu i ekspozycji na mikrocystynę, która została podana około stu gramowym siejom (n=15) w formie iniekcji (10µg MC-LR/200µl roztworu soli fizjologicznej/ryba). Ryby (n= 11) z grupy kontrolnej otrzymały iniekcje roztworu soli fizjologicznej. Z opisu wynika, że krew od badanych ryb pobierano tuż po iniekcji MC-LR, a także 8, 24 i 48 godzin po iniekcji. W tej część pracy brakuje informacji dlaczego wybrano tylko jedno stężenie MC-LR podawane rybom. W opisie założeń doświadczenia, pojawia się tylko informacja, że wybór ten został dokonany na podstawie wcześniejszych badań współautorów publikacji. W części rozprawy dotyczącej opisu toksyczności mikrocystyny-LR brakuje mi informacji dotyczących takich kwestii jak zakres stężeń toksyny w naturalnym środowisku, informacji na jakie stężenia mikrocystyny są narażone organizmy żyjące w zbiornikach, w których dochodzi do mniej lub bardziej intensywnych zakwitów cyjanobakterii oraz jaki poziom MC-LR w jeziorach czy morzach bywa groźny dla kręgowców.

Od ryb z grup kontrolnych i testowych doktorant pobierał krew i wątroby. W celu przeprowadzenia analizy ekspresji miRNA, doktorant izolował RNA z plazmy krwi, przeprowadził syntezę cDNA i wykorzystał metodę RT-qPCR z wykorzystaniem odpowiednio dobranych starterów. Porównawcza makroskopowa analiza wątroby miała wskazać ewentualne zmiany w tym organie po kontakcie z MC-LR. Doktorant już w ósmej godzinie po ekspozycji ryb na toksynę zauważył zwiększoną ekspresję badanych miRNA. Dalszy wzrost wszystkich badanych miRNA postępował wraz z trwaniem doświadczenia i był najwyższy w 48 godzinie. Najwyższy wzrost ekspresji w trakcie eksperymentu dotyczył miR 122-5p. Ta sama analiza przeprowadzona w przypadku ryb z grupy kontrolnej pokazała stabilny poziom ekspresji wszystkich badanych miRNA w trakcie trwania całego doświadczenia. Wątroby pobrane od ryb eksponowanych przez 24 i 48 godzin na działanie toksyny miały zdecydowanie jaśniejszy kolor, a struktura części z nich była naruszona.

Uzyskane wyniki pokazały jednoznacznie negatywny wpływ MC-LR na integralność tkankową w wątrobie ryb oraz ujawniły, że ekspozycja na tę toksynę siei powoduje wzrost ekspresji wybranych miRNA, a szczególnie cząsteczki miR 122-5p co pozwoliło pozytywnie rozstrzygnąć hipotezę mówiącą, że analiza ekspresji tej cząsteczki może być wykorzystana w diagnostyce toksycznego wpływu MC-LR na wątrobę siei.

W drugim artykule naukowym, dociekania doktoranta dotyczyły wpływu mikrocystyny-LR na mózg siei. MC-LR jest hepatotoksyną, ale z badań prowadzonych na ssakach wynika, że może mieć też działanie neurotoksyczne. Zmiany w centralnym układzie nerwowym ssaków wywołane przez MC-LR związane są ze zmianami ekspresji genu kodującego białko GFAP (gliał fibrillaly acidic protein) i miR-124-3p. miR-124-3p jest często spotykaną cząsteczka miRNA w mózgu ssaków i ryb i przez część naukowców uważana jest za specyficzną dla tego organu. W tej części rozprawy doktorant sprawdzał jakie jest powiązanie GFAP i miR-124-3p w mózgu siei eksponowanej na MC-LR. Aby przeprowadzić kompleksowo badania mające wyjaśnić tę ewentualną zależność należało też poznać sekwencję DNA genu GFAP poszukując motywów rozpoznawanych przez w/w miRNA.

Staranny przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat neurotoksyczności MC-LR przedstawiony w pierwszym rozdziale tej publikacji pozwolił w klarowny sposób przedstawić cele naukowe przyświecające doktorantowi podczas prowadzonych badań. Opis materiału i zastosowanych metod daje pełny wgląd w procedury, które zostały implikowane podczas części eksperymentalnej i laboratoryjnej. W przypadku badania neurotoksyczności MC-LR u siei podobnie jak w doświadczeniu opisanym w pierwszej publikacji, doktorant stosował tę samą metodę podania toksyny i jej stężenie. Czas trwania eksperymentu był dłuższy niż w przypadku doświadczenia opisanego w Publikacji 1, mianowicie iniekcje były podawane rybom trzykrotnie w ciągu 21 dni, a pobór tkanek (krew i mózg) do analizy skutków narażenia na MC-LR nastąpił w ciągu pierwszego dnia ekspozycji oraz 2, 7, 14 i 28 dnia trwania eksperymentu. Podobnie jak w przypadku pierwszego artykułu, także tutaj doktorant wykorzystał technikę RT-qPCR w celu zbadania poziomu ekspresji interesujących go genów. Ponadto doktorant uzyskał sekwencje genu GFAP, przeprowadził analizę struktury tej sekwencji oraz przeprowadził badania *in vitro* mające na celu sprawdzenie zależności między GFAP i badaną cząsteczką miRNA.

Uzyskane wyniki wskazały, że GFAP z genomu siei zawiera w swojej budowie miejsce rozpoznawane przez miR-124-3p co mogło wskazywać, że ta cząsteczka miRNA bierze udział w regulacji ekspresji GFAP. Jednak analiza qPCR wykazała, że w trakcie trwającego 28 dni eksperymentu, ekspresja GFAP w mózgu była podwyższona jedynie 7 dnia ekspozycji na MC-LR, a w przypadku badanego miRNA, poziom ekspresji tej cząsteczki we krwi oraz mózgu nie zmieniał się podczas całego okresu ekspozycji. Badania *in vitro* nie potwierdziły zaangażowania miR-124-3p w proces ekspresji GFAP. Przedstawione wyniki pozwoliły odrzucić hipotezę dotyczącą supresji ekspresji gfap przez miR 124-3p.

Doktorant na podstawie uzyskanych wyników stwierdził, że ekspozycja siei na MC-LR może mieć neurotoksyczne konsekwencje, ale bez zaangażowania miR-124-3p. Dlatego też w przypadku siei, projektowanie testu diagnostycznego neurotoksyczności MC-LR na podstawie badania poziomu ekspresji miR-124-3p nie jest zasadne. W tym miejscu chciałbym zapytać doktoranta czy nie kusiło go przeprowadzenie badań histologicznych mózgu ryb eksponowanych na działanie MC-LR.

Calem badań, których wyniki zostały zamieszczone w **trzecim artykule naukowym** składającym się na rozprawę było scharakteryzowanie sekwencji długich niekodujących RNA (lncRNA) w wątrobie siei uzyskanych w wyniku sekwencjonowania RNAseq oraz analiza ekspresji lncRNA w przypadku narażenia ryb na mikrocystynę-LR.

W badaniach wykorzystano ponad 50 ryb, z czego na 30 osobników analizowano skutek ekspozycji na MC-LR. Rybom podobnie jak w przypadku doświadczeń opisanych w Publikacji 1 i Publikacji 2 MC-LR podawano w iniekcji, a próby do badania zmian ekspresji ncRNA pobierano w pierwszym, szóstym, dziewiątym i czternastym dniu po iniekcji. Dodatkowo, w celu utrzymania ekspozycji, rybom podano MC-LR w iniekcji, siódmego dnia po pierwszym podaniu. Transkryptom wątroby siei poddano sekwencjonowaniu metodą RNAseq, a uzyskane dane złożono, a następnie przefiltrowano w taki sposób by ograniczyć dalsze analizy do niekodującej części transkryptomu. Ta część badań była utrudniona ze względu na brak genomu referencyjnego siei. Bioinformatyczna analiza uzyskanych informacji pozwoliła uzyskać nowe dane dotyczące długich niekodujących RNA, których rolę w reakcji na ekspozycję MC-LR przeanalizowano w rozdziale dyskusja. Poziom ekspresji wybranych transkryptów lncRNA potwierdzono dodatkowo z wykorzystaniem metody RT-qPCR.

Już samo poznanie pełnego transkryptomu niekodującego RNA wątroby siei można uznać za naukowy sukces (brak genomu referencyjnego). Część ze zidentyfikowanych w wątrobie siei transkryptów lncRNA uległa zmianie u osobników narażonych na działanie MC-LR (co potwierdza postawioną wcześniej hipotezę), a analiza profili ekspresji wybranych transkryptów pozwoliła opisać dwa etapy przebiegu uszkodzenia wątroby siei przez MC-LR: etap początkowego uszkodzenia wątroby i następujący po niej etap regeneracji tego narządu. Uzyskane wyniki pokazują, że analiza ekspresji wybranych lncRNA może pomóc w diagnozowaniu stanu wątroby siei narażonych na kontakt z mikrocystyną. Można jedynie żałować, że doktorant nie przeanalizował jak zmienia się obraz histologiczny uszkodzonej wątroby, która następnie ulega regeneracji. To dodatkowo przeprowadzone badanie być może pozwoliłaby uzyskać wyniki, które dałyby pełniejszy obraz jak zmienia się mikroskopowo tkanka tego organu po ekspozycji na mikrocystynę-LR.

Ostatnią częścią pracy doktorskiej są oświadczenia współautorów publikacji, które weszły w skład niniejszej dysertacji. Z treści oświadczeń wynika, że Pan mgr Maciej Florczyk był wykonawcą większości molekularnych analiz przeprowadzonych w trakcie realizacji kolejnych zadań badawczych w tym izolacji RNA, przeprowadzenie odwrotnej transkrypcji, analizy sekwencji cDNA, profilowania ekspresji badanych cząsteczek RNA, przygotowania konstruktów wektorowych oraz analizie statystycznej i bioinformatycznej. Ponadto, doktorant brał udział w przygotowaniu manuskryptów publikacji i odpowiedzi na recenzje. Pokazuje to jak rozległa jest wiedza praktyczna doktoranta tak w kontekście działań mających doprowadzić do uzyskania wyników jak i ich rozpowszechnienia. Jestem pod dużym wrażeniem tych umiejętności, które w moim odczuciu zasługują na szczególną pochwałę.

Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych i opisanych w niniejszej pracy doktorskiej wyników stwierdzam, że doktorant w pełni zrealizował zdefiniowane cele naukowe. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składająca się z trzech artykułów naukowych tworzy bardzo spójną całość, a tytuł rozprawy jest adekwatny do jej zawartości. Dzięki uzyskanym wynikom, Pan mgr. Maciej Florczyk mógł zweryfikować postawione na początku rozprawy doktorskiej hipotezy naukowe. Każda kolejna publikacja z niniejszego cyklu pokazuje jak rozwijał się warsztat laboratoryjny doktoranta, który wykorzystywał w swoich badaniach coraz to bardziej zaawansowane techniki analityczne i narzędzia bioinformatyczne, co w konsekwencji doprowadziło do uzyskaniu dużej ilości informacji na temat miRNA siei i ich powiązań z stanem fizjologicznym wątroby i mózgu po ekspozycji na MC-LR. Ilość nowych informacji uzyskanych przez doktoranta w trakcie realizacji kolejnych zadań badawczych jest ogromna i ma duże znaczenie z czysto poznawczego punktu widzenia oraz co bardzo istotne część z tej odkrytej wiedzy może zostać wykorzystana w praktyce. Pojawiające się w niniejszej recenzji drobne uwagi dotyczą głównie braku informacji co do niektórych założeń poszczególnych eksperymentów takich jak wybór modelu do badań, wybór tylko jednej dawki mikrocystyny-LR na jaką eksponowano ryby czy samą metodę ekspozycji i czas jej trwania oraz brak analiz histologicznych organów, które badano w kontekście uszkodzeń wywołanych przez MC-LR, nie zmniejszają znacząco ogólnie bardzo wysokiej oceny pracy doktorskiej Pana Macieja Florczyka.

Wniosek końcowy

Po krytycznym zapoznaniu się z zawartością pracy doktorskiej Pana mgr. Macieja Florczyka, jednoznacznie stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.). Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr Macieja Florczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę doskonały warsztat badawczy doktoranta oraz istotność uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr. Macieja Florczyka.

Konrad Ocalewicz

Konrad Ocalewicz

UNIWERSYTET GDAŃSKI
Zakład Biologii i Ekologii Morza

dr hab. inż. Konrad Ocalewicz
profesor nadzwyczajny