

Kraków, 26-04-2017



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej lekarza medycyny Igora Selmaja pt. „Rola mechanizmów eksportu zewnątrzkomórkowego małych niekodujących RNA w przebiegu autoimmunologicznej demielinizacji w stwardnieniu rozsianym”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lekarza medycyny Igora Selmaja pt. „Rola mechanizmów eksportu zewnątrzkomórkowego małych niekodujących RNA w przebiegu autoimmunologicznej demielinizacji w stwardnieniu rozsianym” porusza ważne zagadnienie naukowe, które dotyczy roli egzosomalnego miRNA jako biomarkera dla stwardnienia rozsianego (SM).

Stwardnienie rozsiane jest przewlekłą chorobą ośrodkowego układu nerwowego, która powstaje w wyniku nieprawidłowej odpowiedzi limfocytów T oraz B na antygeny mieliny prowadząc do powstania reakcji zapalnej, demielinizacji oraz neurodegeneracji. Szacuje się, że na całym świecie na SM choruje około 2,5 mln ludzi, co stanowi poważny problem społeczny i ekonomiczny. Obecnie podstawą rozpoznania SM są tzw. zmodyfikowane kryteria McDonalda, które bazują na obrazie klinicznym oraz wynikach obrazowania OUN w technice rezonansu magnetycznego. Złożoność postępowania diagnostycznego wymusza konieczność znalezienia prostszych i bardziej niezawodnych metod, które umożliwią postawienie szybkiej a zarazem pewnej diagnozy. Obecnie uważa się, że istotną rolę w diagnostyce SM mogą odegrać tzw. biopskaźniki, którymi mogą być czynniki molekularne, genetyczne lub biochemiczne. Na uwagę zasługuje fakt, iż od wielu lat trwają intensywne poszukiwania nie tylko biomarkerów diagnostycznych SM, ale również rokowniczych, które umożliwiłyby przewidzenie przebiegu choroby oraz biomarkerów odpowiedzi terapeutycznej. Wyniki dotychczasowych poszukiwań biomarkerów SM nie są w pełni satysfakcjonujące i pomimo przebadania wielu molekuł do dzisiaj brakuje markerów wiarygodnie korelujących z tą chorobą. W ostatnim okresie zwrócono uwagę na egzosomy i zawarty w nich materiał, który potencjalnie może być bogatym źródłem biomarkerów w SM. W SM egzosomy wydzielane przez oligodendrocyty i

Wydział Nauk o Zdrowiu

Instytut Pielęgniarstwa
i Położnictwa

Katedra Biologii Medycznej

ul. Kopernika 7

31-034 Kraków

tel. +48 12 422 99 49

fax +48 12 422 99 49



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

komórki mieloidalne wykazują korelację z kliniczną i radiologiczną aktywnością choroby. Jednym z najbardziej obiecujących egzosomalnych biomarkerów są małe niekodujące RNA, a wśród nich zwłaszcza miRNA. Stąd też zrodziła się koncepcja badań zawarta w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Rozprawa doktorska lek. med. Igora Selmaja pt. „Rola mechanizmów eksportu zewnątrzkomórkowego małych niekodujących RNA w przebiegu autoimmunologicznej demielinizacji w stwardnieniu rozsianym” została przygotowana w ogólnie przyjęty sposób. Praca doktorska obejmuje 120 stron i zawiera następujące części: Streszczenie, Wstęp, Założenia i cel prac, Metody badawcze, Wyniki, Dyskusja, Piśmiennictwo, Ryciny oraz Tabele. Piśmiennictwo obejmuje 184 pozycje literaturowe, w tym większość cytowanych prac została opublikowana w ciągu ostatnich kilku lat. Dokumentacja uzyskanych wyników badań jest zawarta na 8 rycinach złożonych z wielu części przedstawiających różne parametry badane. Wszystkie ryciny są dodatkowo zaopatrzone w stosowne opisy. We „Wstępie” autor doktoratu dokonał ogólnej charakterystyki schorzenia jakim jest SM z uwzględnieniem epidemiologii. Doktorant bardzo szczegółowo opisał rolę mechanizmów immunologicznych w patomechanizmie SM charakteryzując udział limfocytów Th1 oraz Th17 jak również limfocytów B i przeciwciał. W dalszej części autor dokładnie opisuje mechanizmy komunikacji pomiędzy komórkami za pośrednictwem egzosomów pozwalających na wymianę materiału genetycznego m.in. za pośrednictwem miRNA. Doktorant słusznie kładzie szczególny nacisk na rolę egzosomów w funkcjonowaniu układu odpornościowego oraz patologii SM. W końcowej części rozdziału autor wnikliwie analizuje obecnie dostępne metody diagnostyczne SM i zwraca uwagę na konieczność poszukiwania nowych biomarkerów w SM wiarygodnie korelujących z chorobą. Warto zaznaczyć, że dodatkowo we „Wstępie” zamieszczono 4 ryciny, które ułatwiają czytelnikowi zrozumienie opisywanych przez doktoranta bardzo skomplikowanych zagadnień.

Cel pracy jest jasno sformułowany i obejmuje 7 głównych kierunków badań zmierzających systematycznie do wyjaśnienia bardzo złożonego zagadnienia.

Metodyka badań jest szczegółowo opisana, co sprawia, że czytający pracę nie ma problemu ze zrozumieniem kolejnych etapów badań i zastosowanych procedur badawczych. Dodatkowo metodyka jest wzbogacona

Wydział Nauk o Zdrowiu

Instytut Pielęgniarstwa
i Położnictwa

Katedra Biologii Medycznej

ul. Kopernika 7

31-034 Kraków

tel. +48 12 422 99 49

fax +48 12 422 99 49



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

w rycinę oraz tabelę. Metody eksperymentalne są bardzo dobrze i adekwatnie dobrane do postawionego celu, jaki wyznaczył sobie doktorant. Badania są oparte o badania obrazowania mózgu techniką rezonansu magnetycznego, metody izolacji egzosomów i całkowitego egzosomalnego RNA, badanie egzosomów w oparciu o analizę nanocząsteczek techniką nanoparticle tracking analysis (NTA) oraz szereg wyrafinowanych metod biologii molekularnej, w tym m.in. wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA. Analiza statystyczna została przeprowadzona we właściwy sposób przy zastosowaniu prawidłowo dobranych testów.

Plan badań jest bardzo dobrze przygotowany i konsekwentnie realizowany w przedstawionej do oceny pracy. Wszystkie doświadczenia zostały zaplanowane oraz przeprowadzone perfekcyjnie, a wyciągnięte wnioski są w pełni uzasadnione i logicznie wypływają z uzyskanych wyników.

W pierwszym etapie badań doktorant wyizolował egzosomy z surowicy pacjentów chorych na SM w trakcie rzutu choroby, trakcie remisji oraz zdrowych ochotników metodą immunoprecypitacji. Liczba egzosomów oraz ich parametry morfologiczne zostały określone na drodze analizy nanocząsteczek techniką nanoparticle tracking analysis (NTA). Następnie wyizolowane egzosomy zostały ocenione poprzez wykazanie ekspresji typowych białek egzosomalnych takich jak molekuly Alix oraz CD9. W dalszym etapie badań autor dokonał izolacji całkowitego egzosomalnego RNA, którego jakość oraz ilość ocenił za pomocą techniki Agilent oraz bioanalyzera (Agilent Technologies). Następnie zastosowanie techniki wysokoprzepustowego sekwencjonowania (NGS) pozwoliło doktorantowi uzyskać całkowity profil sekwencji RNA obecnych w egzosomach. Analiza bioinformatyczna przeprowadzona przez autora z użyciem dostępnych baz danych ujawniła, że zawartość RNA w egzosomach jest wysoce zróżnicowana i zawiera wiele różnych frakcji RNA takich jak: miRNA, tRNA, scaRNA, rRNA, piRNA, lincRNA, CDBox, HAcaBox, LINE, LTR, RefSeq eksony oraz introny. Przeprowadzona przez doktoranta dalsza analiza w kierunku identyfikacji unikalnego profilu egzosomalnego miRNA wykazała, że w każdej z próbek egzosomów surowicy znajduje się od 350 do 400 różnych sekwencji miRNA, co potwierdziło, że egzosomy są bogatym źródłem niekodujących RNA. Dokonując globalnej analizy statystycznej i bioinformatycznej doktorant wykrył cztery sekwencje miRNA hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-

Wydział Nauk o Zdrowiu

Instytut Pielęgniarstwa

i Położnictwa

Katedra Biologii Medycznej

ul. Kopernika 7

31-034 Kraków

tel. +48 12 422 99 49

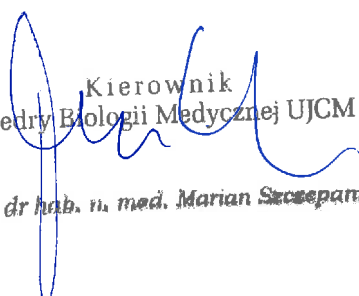
fax +48 12 422 99 49

miR-301a-3p oraz hsa-miR-532-5p w egzosomach surowicy krwi wykazujących znacząco zróżnicowaną ekspresję w zależności od grupy badanej: rzut SM, remisja SM oraz grupa kontrolna. Bardzo cennym spostrzeżeniem jakie poczynił doktorant było to, że wszystkie cztery miRNA cechowała obniżona ekspresja w rzutach SM w porównaniu do poziomów u osób z grupy kontrolnej. W następnym etapie pracy wyniki uzyskane techniką NGS zostały poddane walidacji w dużej niezależnej kohorcie pacjentów chorujących na SM poprzez ocenę ekspresji czterech miRNA techniką ilościowego PCR. Wyniki te w pełni potwierdziły istotnie obniżoną ekspresję hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p oraz hsa-miR-532-5p w egzosomach wyizolowanych od pacjentów z SM. W kolejnym etapie pracy autor dokonał analizy korelacji tych sekwencji miRNA z radiologicznym obrazem aktywności choroby przy użyciu rezonansu magnetycznego. Analiza ta wykazała, że u pacjentów z aktywnymi zmianami, tj. ulegającymi wzmocnieniu po podaniu gadoliny, stężenie egzosomalnych miRNA, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p oraz hsa-miR-532-5p jest znacząco niższe niż w grupie bez zmian aktywnych, tj. bez cech wzmocnienia po podaniu gadoliny. Następnie doktorant podjął się próby identyfikacji potencjalnego źródła krążących w surowicy krwi egzosomów zawierających hsa-miR-122-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-301a-3p oraz hsa-miR-532-5p. W tym celu dokonał on oceny produkcji wspomnianych egzosomów przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PMBC). Obrona strategia badawcza okazała się być w pełni poprawna, gdyż dało się potwierdzić badaniami *in vitro*, że egzosomy produkowane przez PBMC zawierają cztery analizowane miRNA. Co więcej, wszystkie cztery sekwencje badanych miRNA wydzielane przez komórki PBMC wykazywały znacząco obniżoną ekspresję w rzutowej postaci SM w porównaniu do zdrowej kontroli. W końcowej części rozprawy autor podjął się próby wyjaśnienia, w jaki sposób obniżona ekspresja zidentyfikowanych czterech miRNA może wpływać na mechanizmy zachodzące w SM. Doktorant dokonując analizy bioinformatycznej z wykorzystaniem dedykowanej bazy danych, wykrył 74 sekwencje mRNA jako domniemanych, wspólnych celów molekularnych dla wszystkich czterech badanych miRNA. Największą klasę kodowanych białek w ramach wspomnianych 74 sekwencji stanowiły czynniki transkrypcyjne oraz białka wiążące DNA. Na uwagę zasługuje fakt, iż w grupie potencjalnych mRNA

regulowanych przez wszystkie cztery miRNA były transkrypty dla dwóch czynników transkrypcyjnych, STAT3 i AHR, których aktywność jest ściśle związana z procesem różnicowania limfocytów Th17 i komórek regulatorowych (Treg). Wzajemna proporcja limfocytów Th17 i Treg decyduje odpowiednio o istnieniu procesu zapalnego lub stanu tolerancji.

Dyskusja jest napisana w sposób świadczący o rzetelnej znajomości zagadnienia z wykorzystaniem najnowszego piśmiennictwa na ten temat. Szczególnie wartościowa jest dyskusja dotycząca porównania własnych wyników badań z obecnym stanem wiedzy na ten temat.

Ogólna ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Igora Selmaja jest bardzo pozytywna. Praca jest nowoczesnym przedsięwzięciem naukowym zmierzającym do rozwiązania istotnego problemu naukowego, przy którego rozwiązaniu doktorant wykazał się nieprzeciętnymi zdolnościami w pracy naukowej. Praca została przeprowadzona w sposób wzorcowy zarówno pod względem merytorycznym jak i technicznym. W badaniach posłużono się najnowszymi metodami badawczymi. Wnioskowanie jest prawidłowe i wynika z bardzo dobrze zaplanowanych i logicznie uzasadnionych eksperymentów. Dodatkowo o wyjątkowo wysokiej wartości naukowej ocenianej pracy świadczy opublikowanie prezentowanych wyników w 3 czasopismach o łącznym impact factor powyżej 18, jak również uzyskanie finansowania badań z czterech źródeł. Podsumowując jest to najlepsza praca doktorska, jaką miałem okazję recenzować. Z tego też względu oraz z powodu wagi uzyskanych wyników wnoszę o dopuszczenie lek. med. Igora Selmaja do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie pracy.

Kierownik
Katedry Biologii Medycznej UJCM

Prof. dr hab. n. med. Marian Szczepaniak



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Nauk o Zdrowiu

Instytut Pielęgniarstwa

i Położnictwa

Katedra Biologii Medycznej

ul. Kopernika 7

31-034 Kraków

tel. +48 12 422 99 49

fax +48 12 422 99 49