



UNIWERSYTET

JANA KOCHANOWSKIEGO W KIELCACH

WYDZIAŁ LEKARSKI I NAUK O ZDROWIU

www.ujk.edu.pl/wnoz



Wydział Lekarski
i Nauk o Zdrowiu

Dziękuję
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego
wpłynęło dn. 24.06.2019
podpis AC I.dz. 194

Kielce, 16 czerwca 2019

Dr hab. n. med. Waldemar Broła

Profesor nadzw. Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach

Kierownik Działu Neurologii

Szpitala Specjalistycznego w Końskich

Recenzja pracy doktorskiej mgr Dominiki Justyny Książek-Winiarek zatytułowanej:

***“Znaczenie microRNA w rozwoju eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia
w ośrodkowym układzie nerwowym”***

Promotor: prof. dr hab. n. med. Andrzej Głąbiński

Stwardnienie rozsiane jest postępującą zapalno-demielinizacyjną chorobą ośrodkowego układu nerwowego o nieznanym etiologii. Choroba rozpoczyna się zazwyczaj pomiędzy 20.–40. r.ż., co powoduje, że SM jest jedną z najczęstszych przyczyn niesprawności młodych osób. W patogenezie podstawową rolę odgrywa proces autoimmunologiczny przy współudziale czynników środowiskowych oraz predyspozycji genetycznej. Zależności między czynnikami genetycznymi, środowiskowymi, a epigenetycznymi mają istotne, ale jeszcze niezbyt dobrze poznane znaczenie. Bardzo ciekawymi i niedawno zidentyfikowanymi czynnikami epigenetycznymi modulującymi ekspresję genów są mikroRNA. Poprzez regulację procesu translacji prowadzą one do deadenyacji lub rozpadu mRNA. Zaburzona ekspresja mikroRNA może prowadzić do neurodegeneracji, autoagresji czy neurozapalenia będących podstawą chorób takich jak choroby immunologiczne,



neurologiczne, kardiologiczne czy nowotworowe. Liczne badania wskazują na związki pomiędzy zmienionym profilem ekspresji miRNA, a procesami patologicznymi obserwowanymi w rozwoju stwardnienia rozsianego. Wykazano, że jednym z najważniejszych patogennych czynników rozwoju SM są komórki Th17 oraz wydzielana przez nie IL-17A, które są odpowiedzialne za uszkodzenie bariery krew-mózg czy stymulację astrocytów i mikrogleju do produkcji mediatorów zapalenia.

Głównym celem pracy była ocena wpływu czynników modulujących reakcję zapalną na poziom ekspresji mikroRNA w zwierzęcym modelu SM – autoimmunizacyjnym zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego (EAE).

Uważam, że temat podjęty przez Doktorantkę jest niezmiernie ważny, a wyniki pracy przyczynią się do poszerzenia wiedzy i lepszego zrozumienia mechanizmów mających istotne znaczenie w patogenezie stwardnienia rozsianego.

Praca ma klasyczny układ, składa się z obszernego wstępu, precyzyjnie zdefiniowanych celów pracy oraz przedstawienia materiału i metod badawczych. Wyniki oparte na zaawansowanej analizie statystycznej, podane są w czytelny sposób i szczegółowo omówione, a wnioski logicznie wypływają z wyników. Całość pracy liczy 124 strony maszynopisu, w tym 18 rycin i 1 tabelę. Piśmiennictwo zawiera 353 pozycje, w tym ponad 50% opublikowanych po 2010 roku, będących właściwie dobranym materiałem źródłowym dla wstępu i dyskusji.

Część wyników przedstawionych w pracy zamieszczono w dwóch publikacjach:

1. Książek-Winiarek D., Szpakowski P., Turniak M., Szemraj J., Glabinski A. IL-17 Exerts Anti-Apoptotic Effect via miR-155-5p Downregulation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Mol. Neurosci.* 2017; 63: 320–332.
IF = 2,454; MNiSW = 20.
2. Wojkowska D.W., Szpakowski P., Książek-Winiarek D., Leszczynski M., Glabinski A. Interactions between neutrophils, Th17 cells, and chemokines during the initiation of experi-



mental model of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 590409.

IF = 3,236; MNiSW = 30

Wstęp liczący 30 stron maszynopisu, wprowadza czytelnika w problematykę patogenezę SM ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów autoimmunologicznych i jego zwierzęcych modeli. Doktorantka przedstawia hipotezy udziału układu odpornościowego w rozwoju uszkodzeń OUN obserwowanych w SM oraz analizuje czynniki genetyczne i środowiskowe w zainicjowaniu tych procesów. W końcowej części **Wstępu**, w oparciu o liczne pozycje dobrze dobranego piśmiennictwa Doktorantka omawia rolę mikroRNS w rozwoju SM i EAE.

Cele pracy, jakie postawiła sobie Doktorantka, są jasno sprecyzowane i wynikają logicznie z przedstawionego we wstępie pracy problemu klinicznego. Uważam je za bardzo interesujące i dobrze przemyślane.

W rozdziale **Materiał i metody** Doktorantka charakteryzuje metodologię badania na zwierzętach. Materiał do badania stanowiły samice myszy w wieku 8-12 tygodni. Myszy wykorzystywano w dwóch odrębnych eksperymentach. W pierwszym eksperymencie zdrowe zwierzęta oraz zwierzęta immunizowane poddano stereotaktycznej domózgowej iniekcji IL-17A, CXCL-1 lub PBS (w każdej grupie n = 10). W drugim eksperymencie immunizowane zwierzęta zostały uśmiercone w różnych fazach choroby: w fazie przedklinicznej, w fazie objawowej oraz podczas remisji choroby (n = 10 dla każdej grupy).

Celem oceny stanu klinicznego, zwierzęta codziennie ważono i badano według sześciostopniowej skali deficytów neurologicznych (0 – brak objawów choroby; 1 – niedowład ogona lub lekko zachwiany chód ; 2 – bezwład ogona oraz/lub umiarkowanie zachwiany chód; 3 – niedowład kończyn; 4 – bezwład kończyn; 5 – śmierć z powodu choroby)

Wyniki pracy sugerują protekcyjną funkcję IL-17A w fazie przedklinicznej EAE. Wykazano obniżenie ekspresji prozapalnego miR-155-5p pod wpływem działania tej cytokiny w środowisku zapalnym. Ponadto wykazano wzrost ekspresji mRNA dla białek uczestniczących w szlaku sygna-



łowym neurotrofin, tj. *BDNF*, *HRAS*, *BCL2*. Wzrost poziomu białka *HRAS* oraz *Bcl-2* w grupie zwierząt poddanych iniekcji *IL-17A* sugeruje jej potencjalną anty-apoptotyczną funkcję. Doktorantka wykazała również, że domózgowe podanie tej cytokiny skutkowało obniżeniem ilości komórek *Th17* w mózgu, przy niezmienionej liczbie neutrofilii, w porównaniu do grupy kontrolnej.

W prezentowanej pracy analiza profilu ekspresji miRNA w różnych fazach EAE wykazała znaczny wzrost poziomu miR-155-5p dla każdej z badanych faz, potwierdzając jego rolę w patogenezie tej choroby. Obniżenie jego ekspresji pod wpływem działania *IL-17A* może więc skutkować zmniejszeniem nasilenia procesu zapalnego w OUN, bądź aktywacją szlaków przeciwzapalnych.

Przeprowadzone badania pozwoliły również na identyfikację nowego miR potencjalnie zaangażowanego w patogenezę EAE – miR-144-3p. Analiza faz choroby wykazała wzrost poziomu tego miR w fazie przedklinicznej, natomiast w fazie zaostrzenia objawów zaobserwowano spadek jego ekspresji. Również iniekcje domózgowe *IL-17A* i *CXCL-1* wpływały na jego poziom, gdyż zaobserwowano wzrost ekspresji miR-144-3p u myszy immunizowanych. Wyniki badań sugerują, że miR-144-3p reguluje dojrzewanie DC i makrofagów, wydzielanie cytokin, czy proces apoptozy.

Zaprezentowane badania są jednymi z nielicznych wskazujących na protekcyjną funkcję cytokiny *IL-17A* w EAE, i prawdopodobnie są jedynymi wykazującymi związek pomiędzy taką rolą *IL-17A*, a modulacją profilu ekspresji miR-155-5p w OUN.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska została przygotowana na bardzo wysokim poziomie świadczącym o posiadaniu rozległej wiedzy oraz umiejętności samodzielnego planowania i prowadzenia badań. Niewątpliwie wyniki badań będą przyczynkiem do lepszego poznania wciąż niejasnej etiopatogenezy SM.



Na dodatkową uwagę i słowa uznania zasługują również pozostałe prace doktorantki, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej o łącznym IF = 12.563 (MNIŚW 125.000). Wszystkie publikacje są wieloautorskie, a Doktorantka w większości z nich jest pierwszym autorem.

Rozprawa przygotowana pod nadzorem Promotora prof. dr hab. n. med. Andrzeja Głąbińskiego przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia kryteria określone w art. 13 ust. 1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku. Dlatego mam zaszczyt wnieść do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z wielką przyjemnością wnoszę o wyróżnienie rozprawy. Wniosek o wyróżnienie motywuję wysoką jakością i pionierskim charakterem badań, nowatorstwem obserwacji oraz publikacjami w prestiżowych czasopismach z Listy Filadelfijskiej.

Dr hab. n. med. Waldemar Broła


dr hab. n. med. Waldemar Broła
specjalista neurolog
6282486