



Katedra i Klinika Neurologii

Dr hab. med. Beata Zakrzewska-Pniewska
Katedra i Klinika Neurologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa, 10.07.2019r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej **mgr Dominiki Justyny Książek-Winiarek**

**Pt. ZNACZENIE MIKRORNA W ROZWOJU EKSPERYMENTALNEGO
AUTOIMMUNIZACYJNEGO ZAPALENIA W OŚRODKOWYM UKŁADZIE
NERWOWYM**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. **Andrzej Głąbiński**

Klinika Neurologii i Udarów Mózgu
Katedra Chorób Układu Nerwowego
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, powołującą mnie do wypełnienia obowiązków recenzenta w przewodzie doktorskim mgr Dominiki Justyny Książek-Winiarek, przedkładam recenzję rozprawy doktorskiej mgr Dominiki J. Książek-Winiarek, przygotowanej pod kierownictwem naukowym Pana prof. dr hab. med. Andrzeja Głąbińskiego.

Przygotowana przez Doktorantkę rozprawa doktorska odpowiada kryteriom wynikającym z ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. W uzasadnieniu tej oceny przedstawiam następujące uwagi i spostrzeżenia merytoryczne dotyczące recenzowanej rozprawy.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja dotyczy analizy znaczenia mikroRNA w rozwoju eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia w ośrodkowym układzie nerwowym. Jako klinicysta-neurolog zajmujący się także neuroimmunologią kliniczną, z racji posiadanych kompetencji, oceniając pracę pod względem merytorycznym, skoncentruję się głównie na zagadnieniach adekwatnych do moich kompetencji.

Przedmiotem badań Doktorantki jest doświadczalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE), szeroko stosowany model eksperymentalny stwardnienia rozsianego (SM). Warto podkreślić, że stwardnienie rozsiane, przewlekła zapalno-demielinizacyjna choroba ośrodkowego układu nerwowego o podłożu autoimmunologicznym, będąca częstą



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Klinika Neurologii

przyczyną niepełnosprawności u młodych dorosłych, dotyka około 2,3 mln ludzi na całym świecie (Venkatesha i wsp., 2018). Mimo znacznego postępu w zakresie diagnostyki i immunoterapii tego schorzenia, nadal istnieje niezaspokojona potrzeba zidentyfikowania odpowiednio czułych i specyficznych biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych, przydatnych w przypadku SM.

Doktorantka podjęła się w swej dysertacji analizy mikroRNA, niekodujących, krótkich cząsteczek RNA pełniących posttranskrypcyjne funkcje regulacyjne i w związku z tym mających wpływ na ekspresję genów. MikroRNA z uwagi na wielkość cząsteczki mogą swobodnie krążyć w krwiobiegu oraz pokonywać barierę krew-mózg, co czyni je potencjalnymi kandydatami jako biomarkery, także w SM. Ebrahimkhanī i wsp. (2017) wykazali, że mikroRNA może pełnić funkcję nie tylko biomarkera diagnostycznego ale także predykcyjnego. W tym kontekście badania Doktorantki dotyczące aspektów molekularnych EAE i SM mają nie tylko istotny poznawczy ale także nowatorski oraz ważny klinicznie charakter.

Uwagi ogólne

Doktorantka w przesłanej mi do recenzji dysertacji podjęła się przeanalizowania istotnego z punktu widzenia poznawczego oraz klinicznego zagadnienia, jakie stanowi znaczenie mikroRNA w rozwoju EAE.

Należy przy tym podkreślić, że wartość naukowa prezentowanych badań nie budzi wątpliwości, gdyż ich wyniki (w istotnej części) zostały opublikowane w dwóch czasopismach o znaczącym współczynniku oddziaływania (*Mediators of Inflammation* i *Journal of Molecular Sciences*) a Doktorantka jest pierwszym autorem lub współautorem tych publikacji.

Główna uwaga dotyczy spójności pomiędzy tytułem pracy a jej treścią: tytuł rozprawy sugeruje iż będzie ona dotyczyła roli mikroRNA w rozwoju EAE a z tekstu wynika, iż dotyczy ona analizy wpływu cytokin na profil wybranych mikroRNA. Ponadto wraca uwagę we wstępie rozprawy pewna dysproporcja pomiędzy częścią opisującą stwardnienie rozsiane (17 stron) a opisującą EAE (2 strony + 1 rycyna). Podkreślić trzeba natomiast bardzo obszerne i wyczerpujące omówienie zagadnienia mikroRNA i jego roli w patogenezie SM i EAE.



Uwagi szczegółowe

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Dominiki Książek-Winiarek ma układ typowy i liczy łącznie z piśmiennictwem i spisem rycin i tabel 124 strony, z czego 28 stron stanowi „Wstęp”, 1 stronę – „Cele pracy”; „Materiały i metoda” - 16 stron, „Wyniki” – 22 strony, „Dyskusja” i „Wnioski” – 12 stron. Zamieszczono też streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych skrótów. Piśmiennictwo liczy 353 pozycje; jest obszerne i właściwie dobrane, zostało przedstawione w porządku alfabetycznym ale nie zostało ponumerowane, co utrudnia korzystanie z niego w czasie lektury dysertacji.

Właściwa proporcja pomiędzy poszczególnymi częściami rozprawy doktorskiej została zachowana, ale cała praca zyskałaby, gdyby krótsza była część *Wstępu* poświęcona stwierdzeniu rozsianego a dłuższa – EAE, jak napisano już powyżej (praca dotyczy EAE a nie SM).

Praca napisana jest w sposób dość klarowny, ilustrowana jest wieloma rycinami, tabelami, wykresami, dość starannie przygotowana pod względem edytorskim. Praca zyskałaby, gdyby podpisy pod rycinami i tabelami były mniej lakoniczne i zawierały istotne informacje dotyczące przedstawionych danych a szczególnie wyników, które ilustrują.

We *Wstępie* Autorka zawarła dane z piśmiennictwa dotyczące aktualnego stanu wiedzy na temat stwardnienia rozsianego, jego charakterystyki, obrazu klinicznego. Bardzo obszernie omówiono immunopatogenezę SM oraz rolę czynników genetycznych i epigenetycznych w rozwoju tej choroby. Adekwatnie i obszernie przedstawiono dane dotyczące roli mikroRNA w patogenezie SM i EAE.

Cele pracy zostały właściwie sprecyzowane. Głównym celem dysertacji było określenie wpływu ważnych dla patogenezy EAE i SM cytokin IL-17A oraz CXCL-1 na ekspresję wybranych mikroRNA oraz na funkcjonowanie regulowanych przez nie szlaków komórkowych. Powyższy cel osiągnięto poprzez realizację następujących celów pośrednich:

1. Analizę zmian profilu ekspresji mikroRNA indukowanych przez cytokiny zapalne IL-17A oraz CXCL-1 w mózgach zwierząt z eksperymentalnym modelem stwardnienia rozsianego.
2. Ocenę poziomu wyselekcjonowanych mikroRNA w mózgu w różnych fazach klinicznych eksperymentalnego modelu stwardnienia rozsianego.



3. Analizę zmian ekspresji wybranych mRNA w mózgu w szlakach komórkowych regulowanych przez badane miRNA.

oraz:

4. Ocenę zmian w mózgu w zakresie stężeń wybranych białek szlaków komórkowych, regulowanych przez badane miRNA.

Cele pracy zostały zrealizowane w trakcie prowadzonego projektu, o czym świadczą uzyskane wyniki.

W rozdziale dotyczącym *Materiałów i Metod* Doktorantka zdefiniowała materiał badany oraz metody.

Materiał do badań stanowiły samice myszy szczepu SJL w wieku 8-12 tygodni i o wadze ok. 20 g, pochodzące z hodowli Charles River (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Niemcy). Podczas wszystkich eksperymentów zwierzęta przetrzymywano w warunkach SPF (ang. *specific-pathogen-free*) w Zwierzętarni Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Doświadczenia na materiale biologicznym zwierzęcym zostały zaakceptowane przez lokalną Komisję Etyczną.

W dysertacji zastosowano adekwatne metody analiz statystycznych, odpowiadające standardom badań naukowych.

W rozdziale *Metody* szczegółowo opisano algorytm postępowania przyjęty w pracy badawczej: indukcję i ocenę EAE, domózgowe stereotaktyczne mikroiniekcje cytokin i roztworu soli fizjologicznej jako kontroli, metody izolacji mózgu, izolacji RNA, przeprowadzania RT-PCR, analizy ekspresji mikroRNA, identyfikacji genów regulowanych przez badanie mikroRNA, jak również metody izolacji białek. W końcowej części rozdziału poświęconego metodyce badań omówiono wnikliwie metody analizy ekspresji białek (BDNF, IL-10, IL-21, HRas, e-Fos i Bcl). Przedstawiono także metodę oznaczania białka całkowitego (BCA), metodę izolacji komórek jednojądrzastych z mózgu, jak również metodę identyfikacji neutrofilów i limfocytów Th17 w mózgu myszy przy użyciu cytometrii przepływowej.

W *Wynikach* przedstawiono rezultaty analizy zmian ekspresji mikroRNA po iniekcji domózgowej badanych cytokin. Uzyskane wyniki sugerują protekcyjną funkcję IL-17A w fazie przedklinicznej EAE: wykazano obniżenie ekspresji prozapalnego miR-155-5p pod wpływem działania tej cytokiny. Ponadto wykazano wzrost ekspresji mRNA dla białek



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Klinika Neurologii

uczestniczących w szlaku sygnałowym neurotrofin, tj. *BDNF*, *HRAS*, *BCL2*. Dodatkowa analiza wykazała istnienie negatywnej korelacji pomiędzy tymi mRNA, a stężeniem miR-155-5p. Wzrost stężenia białka HRas oraz Bcl-2 w grupie zwierząt poddanych iniekcji IL-17A sugeruje jej potencjalną anty-apoptotyczną funkcję. Dodatkowo wykazano, że domózgowe podanie tej cytokiny skutkowało obniżeniem liczby limfocytów Th17 w mózgu, przy zachowanej liczbie neutrofilii, w porównaniu do grupy kontrolnej.

Doktorantka wykazała w dysertacji, że analiza profilu ekspresji miRNA w różnych fazach EAE pozwala stwierdzić istotny wzrost stężenia 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 przez Doktorantkę badania pozwoliły na identyfikację nowego miR potencjalnie zaangażowanego w patogenezę EAE – miR-144-3p. Analiza różnych faz choroby wykazała wzrost stężenia 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 stężenie, gdyż zaobserwowano wzrost ekspresji miR-144-3p u myszy immunizowanych. Nie udało się jednak zidentyfikować w prezentowanej pracy potencjalnego szlaku, ani docelowych mRNA regulowanych przez miR-144-3p, co potencjalnie mogłoby stanowić cel dalszych badań. Liczne dane literaturowe wskazują na udział tego mikroRNA w procesach proliferacji, migracji i naciekania komórek nowotworowych. Jednym z genów regulowanych przez to mikroRNA jest *Nfe212*, kodujący białko NRF2, pełniące funkcje antyoksydacyjne. Białko to jest celem terapii stosowanej w SM (fumaran dimetylu, DMF, działający za pośrednictwem NRF2). Może to pośrednio dowodzić roli miR-144-3p w patogenezie SM, jednak niezbędne są dalsze badania.

Autorka wykazała protekcyjny wpływ IL-17A w fazie bezobjawowej EAE, głównie poprzez działanie na miR-155-5p oraz wywoływanie nadekspresji białek HRas oraz Bcl-2, co podkreśla anty-apoptotyczną funkcję IL-17A. Zaprezentowane badania mają charakter nowatorski i wskazują na protekcyjną funkcję tej cytokiny w EAE oraz na związek pomiędzy taką rolą IL-17A a modyfikacją profilu ekspresji miR-155-5p w OUN.



W *Dyskusji* Autorka dysertacji szczegółowo podsumowuje uzyskane wyniki własnych badań w odniesieniu do danych z piśmiennictwa. W końcowej jej części Doktorantka poddaje dyskusji kwestię nowego mikroRNA, miR-144-3p, jako potencjalnego modulatora procesów zachodzących w EAE. Doktorantka wykazała, że miR=144-3p charakteryzuje różny stopień ekspresji w różnych fazach EAE oraz pod wpływem działania badanych cytokin. Nie udało się zidentyfikować mRNA ani procesów komórkowych regulowanych przez to miRNA, co potencjalnie mogłoby stanowić przedmiot dalszych badań eksperymentalnych.

Należy dodatkowo podkreślić, że charakter prowadzonych eksperymentów dostarcza cennych informacji na temat mikroRNA związanego bezpośrednio ze strukturą i funkcją OUN na poziomie molekularnym, gdyż badania prowadzone były na materiale uzyskiwanym z mózgow mysich, co pozwala na analizę badanych zjawisk *in situ* w obrębie OUN. Wiele aktualnie publikowanych prac dotyczących roli miRNA w procesach autoimmunologicznych prowadzonych jest na materiale komórek obwodowych (splenocyty) lub dotyczy miRNA izolowanego z surowicy (np. Venkatesha i wsp., 2018).

Pracę kończą *Wnioski*, które nawiązują do celu badań, ale możnaby je wzbogacić o próbę komentarza uzyskanych wyników.

Mimo starannego edytorskiego rozprawy Doktorantka nie ustrzegła się pewnych błędów literowych czy stylistycznych. Autorka dysertacji używa dla EAE tłumaczenia polskiego „eksperymentalne autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego”, podczas, gdy w polskim piśmiennictwie spotyka się zazwyczaj przekład „doświadczalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia” (J. Losy, K. Selmaj). W całym tekście jest dość dużo zapożyczeń językowych z j. angielskiego oraz dosłownych tłumaczeń (np. określenie „leżja” w znaczeniu „zmiana” lub „ognisko” jest zazwyczaj określeniem dla „uszkodzenia” pewnej struktury; „choroba rzutująca” – str. 14; „kompartentalizacja procesu patologicznego” - str. 14; skrót dla nazw przebiegu SM powinien być albo polski albo angielski, t.j. np. RR *MS* a nie RR *SM*; częsty jest szyk angielski wyrazów w zadaniu. Zdarzają się błędy literowe, np. w tytule dysertacji „microRNA” zamiast „mikroRNA”, w podziękowaniach: „Szpakowskiego” a powinno być „Szpakowskiemu”. W pracy powinno się używać dla leku „fumaran dimetylu” nazwy farmakologicznej a nie handlowej. Te błędy edytorskie i stylistyczne nie umniejszają oczywiście wartości merytorycznej pracy.



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Klinika Neurologii

Przedstawione przeze mnie uwagi, zawarte w recenzji nie wpływają na ostateczną ocenę pracy, która jest pozytywna. Na szczególne podkreślenie zasługuje nowatorski charakter dysertacji.

Przedstawiona rozprawa mgr Dominiki Justyny Książek-Winiarek wskazuje, że Doktorantka była bardzo dobrze merytorycznie przygotowana do podjęcia badań dotyczących analizy znaczenia mikroRNA w rozwoju EAE.

Praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Przedkładam Radzie Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr Dominiki Justyny Książek-Winiarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 10.07.2019r.

Dr hab. nauk med.
BEATA ZAKRZEWSKA-PNIEWSKA
Specjalista neurolog
Beata Zakrzewska-Pniewska

Dr hab. med. Beata Zakrzewska-Pniewska