

Łódź, 21.10.2014

Dr hab. n. med. Mariusz Stasiołek, Prof. nadzw. ICZMP
Klinika Neurologii
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki
Rzgowska 281/289
93-338 Łódź

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

magister Magdaleny Justyny Kacperskiej,

pod tytułem:

Ocena ekspresji mikroRNA jako potencjalnych biomarkerów aktywacji układu immunologicznego w przebiegu stwardnienia rozsianego (SM)

Stwardnienie rozsiane (sclerosis multiplex, SM) jest przewlekłym demielinizacyjnym schorzeniem ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Charakterystyczne dla tej choroby rozsiane ogniska uszkodzenia mózgu i rdzenia kręgowego stają się przyczyną różnego rodzaju i stopnia zaburzeń neurologicznych. W zależności od nasilenia i tempa progresji choroby, w przebiegu klinicznym SM może dojść z czasem do bardzo nasilonych deficytów neurologicznych, prowadzących niejednokrotnie do znacznego ograniczenia funkcjonowania pacjenta i obniżenia komfortu życia. Wyniki wieloletnich badań naukowych nad etiopatogenezą SM wskazują na zaburzenia autoagresyjne jako bardzo prawdopodobne podłoże zmian demielinizacyjnych zachodzących w OUN. Nieznane pozostają jednak dokładne mechanizmy prowadzące do inicjacji i rozwoju procesu patologicznego. Wyniki najnowszych badań, prowadzonych w warunkach eksperymentalnych z zastosowaniem zwierzęcego modelu choroby (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), jak i

obserwacje poczynione u pacjentów sugerują bardzo istotne znaczenie interakcji pomiędzy limfocytami Th1 i Th17 w procesach prowadzących do zmian zapalnych OUN u pacjentów z SM. Znaczącą rolę w patogenezie SM wydają się również odgrywać elementy humoralnego układu odpornościowego. Co więcej, sugeruje się obecność w tej chorobie nieprawidłowości na poziomie immunoregulacyjnym, mogących być wynikiem zaburzeń wzajemnych interakcji wielu zróżnicowanych składników komórkowych układu odpornościowego, a zwłaszcza: komórek prezentujących antygen i regulatorowych limfocytów T. Ze względu na tak złożony, heterogenny i w dużej mierze niejasny obraz immunopatologii SM, ciągle aktualny pozostaje problem braku narzędzi diagnostycznych pozwalających na lepszą ocenę stanu aktywności procesu patologicznego u poszczególnych pacjentów i/lub efektywne prognozowanie przebiegu klinicznego choroby.

Mając na uwadze powyższą problematykę, w swojej pracy mgr Magdalena Kacperska podjęła bardzo nowatorski temat możliwości zastosowania wybranych cząsteczek mikro RNA (miR) obecnych w płynach ustrojowych pacjentów jako biomarkerów aktywności procesu chorobowego w SM. Doniesienia naukowe ostatnich lat wskazują na istnienie skomplikowanego układu regulacyjnego opartego na cząsteczkach mikro RNA o bardzo zróżnicowanej strukturze, specyficzności oraz aktywności. Układ ten poprzez modulację ekspresji wielu istotnych biologicznie molekuł bierze udział w kontroli przebiegu znaczącej ilości zjawisk fizjologicznych i patologicznych, w tym związanych z funkcją układu odpornościowego, zarówno na poziomie wewnątrz- jak i zewnątrz-komórkowym. Do swoich badań doktorantka wybrała trzy cząsteczki mikro RNA (miR-let-7a, miR-92a oraz miR648) o udowodnionym zaangażowaniu w regulację czynności układu immunologicznego i/lub ośrodkowego układu nerwowego. Ze względu na chęć określenia potencjalnych zastosowań tych cząsteczek jako biomarkerów, w swojej pracy doktorantka oznaczała poziom ekspresji wybranych mikro RNA w osoczu krwi obwodowej chorych, czyli w materiale biologicznym łatwym do uzyskania nawet w przypadku konieczności wielokrotnych oznaczeń. Poziom ekspresji mikro RNA w osoczu badany był u 37 pacjentów z rzutowo-remisyjną postacią SM, podzielonych na dwie grupy: grupę 20 pacjentów w trakcie rzutu choroby oraz grupę 17

pacjentów pozostających w remisji klinicznej. Ponadto do swoich badań doktorantka wprowadziła grupę kontrolną 30 osób zdrowych. Uzyskane wyniki porównywane były pomiędzy grupami, a w przypadku pacjentów z SM wyniki analizowane były również w korelacji z danymi klinicznymi uwzględniającymi takie parametry jak: roczny współczynnik rzutów choroby, liczba przebytych rzutów choroby, zaawansowanie choroby oceniane na podstawie wyniku w skali EDSS oraz z danymi laboratoryjnymi obejmującymi rozkład subpopulacji leukocytów krwi obwodowej. Dodatkowym elementem pracy była ocena stężenia czynnika martwicy nowotworów (TNF) - alfa w osoczu pacjentów włączonych do badania. Cytokina ta należy do jednych z najistotniejszych prozapalnych składników układu odpornościowego, a jej zaangażowanie w immunopatogenezę SM postuluje się od wielu lat na podstawie wielu obserwacji poczynionych u pacjentów oraz wyników badań z zastosowaniem modelu EAE. Kolejnym nowatorskim elementem pracy było skorelowanie pomiarów stężenia TNF-alfa z poziomem ekspresji badanych cząsteczek mikro RNA w osoczu pacjentów z SM. Wszystkie z zaplanowanych pomiarów przeprowadzone zostały z zastosowaniem wiarygodnych, sprawdzonych w odpowiednich zastosowaniach technik laboratoryjnych takich jak RT-PCR oraz ELISA.

W wyniku szczegółowej analizy statystycznej rezultatów przeprowadzonych badań doktorantka stwierdziła istotną różnicę poziomu ekspresji dwóch cząsteczek mikro RNA w osoczu krwi obwodowej (miR-let-7a oraz miR92a) pomiędzy pacjentami w remisji SM a grupą kontrolną. Co ciekawe, parametry te u pacjentów z rzutem choroby nie różniły się statystycznie od grupy kontrolnej. Dodatkowo mgr Magdalena Kacperska wykazała ujemną korelację liniową pomiędzy ekspresją miR-92a w osoczu pacjentów z zaostrzeniem choroby a zaawansowaniem SM ocenianym w skali EDSS. Stwierdziła również dodatnią korelację liniową pomiędzy ekspresją miR-648 w osoczu a liczbą przebytych rzutów choroby w grupie obejmującej wszystkich badanych pacjentów z SM.

Interesującym jest fakt, że pomimo braku istotnych korelacji pomiędzy poziomem ekspresji badanych cząsteczek mikro RNA a stężeniem TNF-alfa w osoczu pacjentów z SM, w grupie

osób zdrowych doktorantka stwierdziła istotne statystycznie ujemne korelacje liniowe pomiędzy ekspresją miR-let-7a oraz miR-92a a poziomem TNF-alfa w osoczu.

Należy podkreślić, że jak do tej pory istnieje bardzo niewiele danych literaturowych na temat charakterystyki ekspresji poszczególnych cząsteczek mikro RNA u pacjentów z SM, w związku z czym podjęcie tego tematu przez mgr Magdalenę Kacperską stanowi istotny wkład w rozwój wiedzy nad mechanizmami molekularnymi leżącymi u podstaw procesów patologicznych w SM. Wartość pracy podkreślają dodatkowo stwierdzone korelacje ekspresji niektórych z badanych parametrów z przebiegiem klinicznym SM, co może i powinno stać się podstawą do dalszych badań na większych grupach pacjentów z uwzględnieniem nie tylko fazy choroby ale również stosowanego leczenia. Tego typu obserwacje mogą potencjalnie stać się w przyszłości podstawą do dalszej indywidualizacji podejść terapeutycznych w SM, a także do prób bieżącego monitorowania przebiegu terapii oraz prognozowania jej skuteczności.

Recenzowana rozprawa ma standardowy układ i składa się ze wstępu, celów pracy, materiału i metodyki, wyników, dyskusji, wniosków, piśmiennictwa oraz streszczeń polskich i angielskich. We wstępie doktorantka opisuje obszernie aspekty epidemiologiczne, kliniczne oraz etiopatogenetyczne stwardnienia rozsianego. Dużo uwagi poświęca zaburzeniom funkcji układu odpornościowego stwierdzanym zarówno u pacjentów z SM, jak również opisanym w zwierzęcym modelu tej choroby. Doktorantka zamieszcza we wstępie także szczegółowe informacje na temat powstawania i funkcji cząsteczek mikro RNA, uzasadniając jednocześnie w sposób całkowicie jasny i nie budzący wątpliwości celowość doboru tematyki badań. Na uwagę zasługuje fakt, iż wstęp został wzbogacony o 3 ryciny w istotny sposób ułatwiające zrozumienie podawanych informacji.

Wydaje się jednak, że w obszernym wstępie nie udało się doktorantce uniknąć nadmiernych uproszczeń dotyczących istoty procesu zapalnego w SM – teoria autoimmunologicznego tła choroby podawana jest jako udowodniona, a wiele obserwacji co do postulowanych mechanizmów komórkowych czy molekularnych prezentowane jest w sposób zbyt kategoryczny, bez zaznaczenia istnienia w literaturze fachowej wielu, niewspominanych w

opracowaniu, alternatywnych wyjaśnień obserwowanych zaburzeń. Pośród dość licznych drobnych błędów (np. nieprawidłowy skrót od słowa interferon), w tym miejscu należy zwrócić uwagę, że nie w pełni uzasadnione jest kilkakrotne proste zaliczenie remielinizacji do mechanizmów chorobowych SM – możemy tu raczej mówić o niepełnej lub niewłaściwej remielinizacji w odróżnieniu od remielinizacji prawidłowej, która jest procesem naprawczym właściwym dla zdrowego organizmu. Korekcji wymaga również nomenklatura haplotypu HLA-DR15, obejmującego szereg alleli, w których nazwie pojawia się dopiero skrót „DRB” z odpowiednią numeracją.

Cele pracy sformułowane są w sposób prawidłowy i przedstawione w jasny sposób.

W rozdziale „Materiał i metodyka” opisane są szczegółowo grupy pacjentów i osób zdrowych a także metodyka pobierania i analizy materiału biologicznego pod kątem ekspresji mikro RNA oraz stężenia TNF-alfa. Doktorantka nie podaje jednak sposobu określania struktury subpopulacji leukocytów krwi obwodowej – jednego z istotnych parametrów dalszej analizy. Rozdział „Wyniki” zawiera 11 rycin oraz 9 tabel przedstawiających w sposób przejrzysty i uporządkowany uzyskane przez doktorantkę rezultaty, każdorazowo z czytelnie zaprezentowanymi danymi z analizy statystycznej. Z niejasnych względów doktorantka nie włączyła w tekst rozprawy ryciny 11 i 12 oraz tabeli 8, pomimo tego, że wspomniane ryciny i tabela wymienione zostały w odpowiednio w „Spisie Rycin” i „Spisie Tabel”. Brak jest również opisu porównania grupy kontrolnej i grup badanych pod względem parametrów demograficznych.

W dyskusji mgr Magdalena Kacperska omawia uzyskane wyniki w konfrontacji z dotychczasową wiedzą na temat złożonych właściwości biologicznych cząsteczek mikro RNA oraz roli tego układu regulacyjnego w SM. Na tym tle w umiejętny sposób podkreśla potencjalne znaczenie obserwowanych zmian ekspresji i/lub aktywności mikro RNA w osoczu pacjentów z SM jako biomarkerów przydatnych w monitorowaniu aktywności procesu patologicznego w tej chorobie. Dodatkowo doktorantka w przekonujący sposób zwraca uwagę na nowatorstwo uzyskanych w przebiegu pracy wyników oraz ich rolę w rozwoju dalszych badań nad patogenezą SM, a także zastosowaniem markerów molekularnych w

praktyce klinicznej. W części dyskusji poświęconej interpretacji uzyskanych wyników niejasna wydaje się jednak próba odnoszenia niskich stężeń cząsteczki białkowej TNF-alfa w surowicy do krótkiego okresu półtrwania mRNA tej cytokiny w danym środowisku zewnątrzkomórkowym.

W rozdziale „Wnioski” doktorantka formułuje pięć głównych konkluzji, będących bezpośrednim odzwierciedleniem uzyskanych rezultatów oraz jeden wniosek ogólnie podsumowujący potwierdzenie hipotezy badawczej przez uzyskane wyniki.

Recenzowana rozprawa doktorska zawiera 258 pozycji piśmiennictwa, w większości dobranych i zacytowanych adekwatnie do potrzeb. W odniesieniu do skomplikowanej dziedziny naukowej objętej tematem badania fakt ten potwierdza dogłębne przygotowanie tematu przez doktorantkę.

W podsumowaniu stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska opiera się na starannie przeprowadzonych badaniach klinicznych i laboratoryjnych z wykorzystaniem wyjątkowego materiału biologicznego, uzyskane dane nie budzą wątpliwości metodologicznych, czy statystycznych i mogą mieć istotne znaczenie kliniczne jako platforma do dalszych badań nad immunopatologią SM. Temat ten w dalszym przebiegu badań może również znaleźć zastosowanie w monitorowaniu przebiegu klinicznego i skuteczności terapii SM. W związku z tym przedstawiona praca spełnia wymogi rozprawy na stopień doktora.

Na podstawie analizy rozprawy doktorskiej o wnioskuje o dopuszczenie mgr Magdaleny Justyny Kacperskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

z poważaniem,
Mariusz J. Stępień