

Recenzja

pracy doktorskiej lek. med. Anny Elżbiety Żurawskiej pt.: **"Znaczenie kolistych RNA (circRNA) w immunologii stwardnienia rozsianego"**
pod promotorstwem prof. dr hab. n. med. Krzysztofa Selmaja

Stwardnienie rozsiane jest przewlekłą, zapalną chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN) o podłożu autoimmunologicznym o nieznanym przyczynie i zmiennym przebiegu klinicznym. Choroba ta stanowi najczęstszą przyczynę niepełnosprawności u młodych osób.

Główna teoria tłumacząca patogenezę SM opiera się na koncepcji autoimmunologicznej. Pacjenci mają uwarunkowaną genetycznie predyspozycję do zaburzonej reaktywności układu odpornościowego. Na tym podłożu nieznanymi czynnikami etiologicznymi aktywuje się układ immunologiczny i powoduje uruchomienie reakcji autoagresji przeciwko własnym strukturalnym centralnego układu nerwowego. To prowadzi do przenikania tych komórek do ośrodkowego układu nerwowego i tworzenia ognisk zapalnych zlokalizowanych wokół naczyń krwionośnych. Dalsza aktywacja komórek w obrębie CUN oraz uruchomienie całej kaskady procesów patologicznych prowadzi do rozległego uszkodzenia struktur istoty białej oraz postępującego zaniku mózgowia i rdzenia kręgowego. Obraz patologiczny wskazuje, że istotą procesu chorobowego jest powstawanie ognisk demielinizacji z wtórnym przerostem komórek glejowych oraz uszkodzeniem wypustek aksonalnych w obrębie szlaków nerwowych. W miarę postępu choroby obszary uszkodzenia powiększają się i zaznacza się postępujący zanik CUN, będący główną przyczyną nieodwracalnego deficytu neurologicznego. Należy pamiętać, że uruchamiane są jednocześnie mechanizmy ochronne oraz regeneracji, które warunkują powrót funkcji neurologicznych i mogą być szczególnie aktywne w przypadkach o łagodnym przebiegu choroby.

Pomimo dużych postępów w terapii ukierunkowanych na hamowanie procesu zapalnego, co wpływa na opóźnienie narastania nieodwracalnego deficytu neurologicznego u pacjentów, niestety nadal nie ma skutecznego leczenia przyczynowego mogącego zahamować lub odwracać procesy patologiczne towarzyszące SM. Tak heterogenna i złożona patogenetycznie choroba wymaga precyzyjnych metod diagnozowania i monitorowania jej aktywności i postępu. Technika rezonansu magnetycznego pozostaje złotym standardem w tym zakresie ale brakuje metod o wyższej specyficzności dla poszczególnych składowych procesów patologicznych aby indywidualizować postępowanie u pacjentów. W szczególności znany jest fenomen paradoksu kliniczno-radiologicznego, w którym aktywność rezonansowa nawet 20-krotnie jest bardziej nasiloną niż

obecność jawnych klinicznie rzutów choroby. Dlatego też, konieczne jest poszukiwanie nowych metod w oparciu o materiał biologiczny dostępny od chorych w celu identyfikacji osób z nawet utajaną klinicznie aktywnością choroby.

Autorka w swej pracy postawiła sobie za cel zbadanie udziału kolistego RNA (circRNA) w patogenezie SM a w szczególności określenia jego wartości jako potencjalnego biowskaźnika rzutów choroby.

W dalszej kolejności Autorka w sposób bardzo logiczny i przemyślany formułuje szczegółowe cele niniejszej dysertacji:

- zebranie materiału biologicznego oraz izolacja PBMC, a następnie RNA od chorych na RRMS oraz od dobranych pod względem płci i wieku osób zdrowych.
- jakościowa i ilościowa ocena ekspresji circRNA przy pomocy mikromacierzy.
- potwierdzenie wyników profilu circRNA uzyskanego przy pomocy mikromacierzy poprzez pomiar wybranych circRNA w komórkach PBMC uzyskanych od nowej, niezależnej grupy chorych na RRMS i niezależnej, dobranej pod względem wieku i płci grupy kontrolnej wykorzystując technikę qPCR.
- ocena korelacji circRNA o zróżnicowanej ekspresji w RRMS z aktywnością kliniczną i rezonansową choroby.
- bioinformatyczne określenie potencjalnych miRNA oraz mRNA regulowanych przez ujawnione w poprzednich etapach circRNA.

Do realizacji wyżej wymienionych celów autorka zaprojektowała protokół badania, w którym kolejno weryfikuje swoje hipotezy naukowe.

Na najwyższe uznanie zasługuje opracowanie bardzo dokładnego i logicznego schematu przeprowadzonej analizy z zastosowaniem najnowocześniejszych technik badawczych. Przyjęte metody badawcze zgodne są z międzynarodowymi standardami tego typu badań naukowych. Autorka przeprowadziła szczegółową i dobrze dobraną metodykę statystyczną analizując uzyskiwane wyniki.

Opis wyników jest bardzo staranny i klarowny stanowiąc logiczną konsekwencję podjętych metod badawczych.

W podobnym układzie, Doktorantka przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników odnosząc się do dostępnej literatury w piśmiennictwie światowym.

W tym miejscu z obowiązku recenzenta pragnę wyrazić kilka uwag:

- Doktorantka zamieściła dość uproszczony opis charakterystyki pacjentów uczestniczących w badaniu. Warto by jednak uzupełnić dysertację o bliższe szczegóły co do faktu leczenia z okresu sprzed 3 miesięcy poprzedzających pobranie materiału (czy stosowano w przeszłości leki immunosupresyjne czy immunomodulujące?) co mogłoby mieć wpływ na uzyskane wyniki.

Zachęcałbym do uszczegółowienia danych klinicznych również o charakterystykę aktywności i nasilenia choroby u tych pacjentów np. o zmianę wyniku EDSS w trakcie rzutu versus okres sprzed rzutu oraz roczny wskaźnik rzutów z ostatniego roku (2 lat) przed włączeniem do badania. To mogłoby dostarczyć więcej danych o roli circRNA jako markera aktywności choroby.

Ciekawe by było również określenie zmienności ekspresji circRNA u tych samych osobników z uwzględnieniem okresów rzutowych oraz remisji i ocenie czy ich ekspresja jest zmienna w czasie co oczywiście może być przedmiotem dalszych badań jako kontynuacja niniejszego projektu.

Autorka sformułowała wnioski bezpośrednio podsumowujące uzyskane wyniki na podstawie kolejnych etapów swoich prac analitycznych na końcu rozdziału Dyskusja:

- uzyskane wyniki wskazują na istotnie zwiększoną ekspresję circRNA:hsa_circRNA_101348, hsa_circRNA_102611 i hsa_circRNA_104361 w PBMC u pacjentów z RRMS w okresie rzutu choroby.
- Powinowactwo tych trzech circRNA do grupy cząsteczek miRNA stwarza możliwość dla dwupoziomowego oddziaływania na proces transkrypcji białek w SM.
- Spośród pięciu zidentyfikowanych białkowych transkryptów dwa kontrolują funkcje limfocytów B. Tak więc circRNA mogą mieć wpływ na jeden z najbardziej istotnych elementów patogenezy SM.

Praca stanowi kontynuację badań w Katedrze i Klinice Neurologii UWM w Olsztynie dotyczących patogenezy stwardnienia rozsianego. Ośrodek neurologiczny w Olsztynie tworzony przez prof. dr hab. n. med. Krzysztofa Selmaja jest słynny i niezwykle ceniony za granicą. Niniejsza dysertacja ma charakter nowatorski i jest oryginalna oraz wnosi wiele nowych danych do całego spektrum procesów patologicznych w patogenezie SM. Doktorantka wykazała się dużą dojrzałością, starannością i rzetelnością naukową, co bardzo dobrze wróży na przyszłość dla jej kariery naukowej.

Dlatego też, mam zaszczyt wnosić do Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie lek. med. Anny Elżbiety Żurawskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnoszę o nadanie **wyróżnienia**.

Z poważaniem,

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Neurologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Prof. dr hab. n. med. Konrad Rejdak