



III KATEDRA PEDIATRII

KLINIKA CHOROÓB ZAKAŻNYCH I NEUROLOGII DZIECIĘCEJ

ul. Szpitalna 27/33
60-572 Poznań

tel. 061 8491.362
fax 061 8491.362

Poznań, 16.07.2020

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Eweliny Marii Kałużnej

Tytuł rozprawy: Ekspresja i oddziaływanie wybranych mikroRNA z docelowymi mRNA w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C

Promotor: prof. dr hab. Jerzy Nowak

Promotor pomocniczy: dr hab. med. Marta Fichna

Od identyfikacji wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) minęło ponad trzydzieści lat. W okresie tym poznano budowę, cykl replikacyjny, szereg właściwości wirusa, drogi i objawy kliniczne wywołanych nim zakażeń, poczyniono znaczne postępy w diagnostyce oraz terapii chorób. Ustalono, że HCV wykazuje powinowactwo do wątroby, powodując jej ostre i przewlekłe zapalenia, rzadziej także manifestacje ze strony innych narządów.

Mimo wymienionych tu bezsprzecznych sukcesów w dziedzinie wirusologii i medycyny, infekcje HCV stanowią nadal poważne zagrożenie zdrowotne dla ludności Polski i świata. Jedną z przyczyn jest brak powszechnych badań przesiewowych w celu wykrycia osób o bezobjawowym zakażeniu HCV. Tymczasem długi okres wylęgania choroby, na ogół niezauważony przebieg jej ostrej fazy sprawiają, że rozpoznanie stawiane jest często po wielu latach, w związku z ciężkimi powikłaniami w postaci marskości czy raka wątroby. Wprawdzie nowoczesna terapia przewlekłego zapalenia wątroby polegająca na stosowaniu leków o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym jest wysoce skuteczna i powoduje niewiele objawów niepożądanych, nadal jednak pozostaje grupa pacjentów, u których nie uzyskuje się eliminacji HCV. Toczący się u tych chorych przewlekłe proces zapalny w wątrobie prowadzi do jej włóknienia lub do nowotworzenia.

Przełomem w biologii molekularnej było odkrycie zjawiska RNAi. Dynamicznie rozwinęły się badania mające na celu określenie wpływu małych regulatorowych RNA na

oddziaływania między wirusem a gospodarzem oraz możliwości wykorzystania tych cząsteczek jako nowych markerów przebiegu chorób wirusowych i skuteczności terapii.

Rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Kałużnej poświęcona ocenie ekspresji i oddziaływań wybranych mikroRNA (miRNA) z docelowymi mRNA w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C wpisuje się w ten ciekawy, ważny i ciągle aktualny nurt prac badawczych.

Ocena merytoryczna pracy

Prezentowane przez Doktorantkę badania są próbą wykorzystania specjalistycznych metod molekularnych do lepszego zrozumienia procesów klinicznych, a zatem mogą mieć istotne implikacje zarówno naukowe, jak praktyczne.

We Wstępie mgr Ewelina Maria Kałużna w oparciu o piśmiennictwo przedstawia informacje na temat dwóch głównych zagadnień poruszanych w rozprawie, wirusowego zapalenia wątroby typu C oraz miRNA. Doktorantka opisuje między innymi budowę i cykl replikacyjny HCV, przebieg kliniczny choroby, znane czynniki mogące mieć wpływ na rozwój przewlekłego zapalenia wątroby typu C oraz aktualne możliwości terapii. Autorka zwraca uwagę, na najczęstszą drogę zakażenia jaką są zabiegi medyczne i inne czynności związane z naruszeniem ciągłości tkanek. Celem uzupełnienia należy zauważyć, że do zakażenia HCV dochodzi na ogół podczas wykonywania drobnych zabiegów medycznych, wykonanych bez przestrzegania właściwych procedur, a ryzyko zakażenia HCV rośnie wraz z liczbą hospitalizacji. Istotną grupę chorych stanowią pacjenci oddziałów hematoonkologicznych i dializoterapii. Wysoki jest także odsetek zakażonych HCV wśród osób przyjmujących środki odurzające drogą dożylną, zwłaszcza z koinfekcją ludzkim wirusem niedoboru odporności. Autorka zwraca uwagę na charakterystyczną dla wirusów RNA dużą zmienność genetyczną jako przyczynę nieefektywnej odpowiedzi immunologicznej gospodarza i powstawania oporności na leki.

W drugiej części Wstępu Doktorantka opisuje szczegółowo biogenezę i mechanizm działania miRNA. Przedstawia drogę powstawania tych cząsteczek w szlaku kanonicznym i niekanonicznym, ich rolę jako biomarkerów chorób wirusowych. W dalszej części Autorka prezentuje mechanizmy regulacji bezpośredniej i pośredniej, za pomocą których miRNA wpływa na cykl replikacyjny HCV, a następnie postulowaną modulację przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby typu C. Rozdział dostarcza szeregu informacji ważnych dla zrozumienia dalszej części pracy. Mimo, że jest dość obszerny, to należy stwierdzić, że zakres poruszanych zagadnień jest w pełni uzasadniony. Zamieszczone we Wstępie ryciny i tabele

bardzo ułatwiają analizę opisywanych zjawisk. Na uznanie zasługuje także poprawność z jaką Doktorantka pisze o zagadnieniach medycznych, mimo że z wykształcenia nie jest lekarzem. Drobnym uchybieniem jest używanie określenia cykl życiowy HCV, co w kontekście wirusów, które nie są zaliczane do organizmów żywych, wydaje się niewłaściwe. Należy raczej mówić o cyklu replikacyjnym. Ponadto podany przez Doktorantkę okres inkubacji zapalenia wątroby od 3 do 12 tygodni, jest krótszy niż się powszechnie przyjmuje. Większość źródeł podaje czas do 150 dni.

Zasadniczym celem pracy było poznanie znaczenia wybranych miRNA dla rozwoju i przebiegu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C. Autorka sformułowała 3 cele szczegółowe i 6 hipotez badawczych. Cele pracy i hipotezy badawcze są jasne i jednoznaczne.

W kolejnym rozdziale Pacjenci, Materiał i Metody Doktorantka bardzo szczegółowo opisuje zróżnicowaną metodykę pracy. Podstawowym materiałem do badań była krew, pozyskana od 180 pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C będących pod opieką Wielospecjalistycznego Szpitala Miejskiego im. Józefa Strusia w Poznaniu oraz 120 zdrowych dawców. Doktoranta nie podaje w jaki sposób rekrutowała osoby należące do grupy kontrolnej. Wśród chorych były zarówno osoby przed leczeniem, jak i po terapii przeciwwirusowej, przeprowadzonej z różnym efektem. Do kolejnych etapów pracy Doktorantka włączała różne pod względem liczby, jak i fazy choroby grupy pacjentów oraz grupy kontrolne, które były porównywalne do grupy badanej pod względem liczby osób, ich wieku czy płci.

Do wstępnej oceny poziomu miRNA w osoczu badanych Autorka wybrała 179 cząsteczek mających potencjalny związek z przebiegiem przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C. Badaniem tym, które nazwała przesiewowym objęła 18 chorych, podzielonych na trzy sześciuosobowe podgrupy w zależności od uzyskanych efektów leczenia, oraz 6 osób zdrowych. Na tym etapie materiał poddawany analizie pobrany od badanych zakwalifikowanych do poszczególnych podgrup był łączony. Walidacji poziomu wybranych miRNA dokonano w grupie 65 chorych zakażonych genotypem 1 wirusa, uprzednio nieleczonych przeciwwirusowo oraz 69 osób z grupy kontrolnej.

Na podstawie analiz bioinformatycznych wytypowano dla wybranych miRNA docelowe mRNA. DNA do badań polimorfizmu genu *PNPLA3* w regionie wiązania miRNA wyizolowano z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej 117 chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, zakażonych genotypem 1 oraz 80 osób zdrowych. Dla oceny wpływu miRNA na cykl replikacyjny HCV *in vitro* wykorzystano linię komórkową Huh 7.5 (linia ludzkich komórek raka wątrobowokomórkowego). W testach lucyferazowych

służących ocenie oddziaływań miRNA-mRNA jako kontrolną wykorzystywano linię HEK293T (linia ludzkich komórek embrionalnych nerki). W dalszej części tego rozdziału mgr Ewelina Maria Kałużna opisuje zastosowane materiały, w tym analogi i inhibitory miRNA, siRNA, startery, sondy, plazmidy, przeciwciała, a także przedstawia bazy danych wykorzystywane do analiz. Następnie Autorka prezentuje szczegółowo metodykę pracy, między innymi izolację kwasów nukleinowych, reakcję odwrotnej transkrypcji, ilościową metodę oceny poziomu RNA, technikę Western blot, technikę analizy krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości, zasady przygotowania plazmidów reporterowych, czy testy lucyferazowe. Autorka opisuje badania replikacji i infekcyjności HCV *in vitro*, zasady analizy proliferacji komórek, cyklu komórkowego oraz apoptozy. Na zakończenie rozdziału przedstawione zostały zastosowane metody statystyczne.

Kolejny fragment pracy stanowią rozdziały, w których zaprezentowane i omówione zostały wyniki badań. Na ich podstawie można stwierdzić, że Doktorantka zrealizowała postawione zadania, a uzyskane rezultaty są interesujące. Wyniki zostały przedstawione zwięźle, z należytą starannością, zestawione w formie czytelnych tabel i rycin.

Na podstawie rezultatów oznaczeń 179 miRNA u osób z grupy badanej i kontrolnej Autorka wykazała, że w przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby typu C zmienia się profil tych cząsteczek w osoczu. Do dalszych analiz Doktorantka wybrała 5 miRNA, których różnica w poziomie w osoczu u chorych i zdrowych była największa, miR-106b-3p, miR-145-5p, 324-5p, miR331-3p, miR-335-3p. Autorka uzyskała szereg ciekawych wyników. Wykazała między innymi zależność między podwyższeniem poziomu miR-145-5p w osoczu krwi a większą aktywnością AST i GGTP w surowicy oraz podwyższeniem poziomu miR-106b-3p oraz miR-331-3p a podwyższoną aktywnością AST w surowicy osób z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. Ponadto stwierdziła, że miR-106b-3p, miR-331-3p oraz miR-335-3p wpływają na proliferację, cykl komórkowy oraz apoptozę komórek linii Huh7.5, a wszystkie zmniejszają replikację HCV *in vitro*. Doktorantka wykazała bezpośrednią interakcję miR-106b-3p z mRNA *STAT5B* oraz miR-335-3p z mRNA *PNPLA3*. Uzyskane wyniki potwierdziły, że wybrane miRNA mogą modulować przebieg zakażenia HCV.

W Dyskusji Autorka omawia uzyskane wyniki badań ciekawie i dojrzałe, zestawiając je z danymi z bardzo różnorodnego i licznie zgromadzonego piśmiennictwa. Wnioski z wykonanych badań są sformułowane jasno i dowodzą, że Doktorantka zrealizowała postawione w pracy cele i zweryfikowała hipotezy badawcze.

Ocena formalna pracy

Mgr Ewelina Maria Kałużna poprawnie sformułowała hipotezy badawcze, właściwie dobrała i zastosowała metodykę.

Pod względem formalnym rozprawa nie budzi istotnych zastrzeżeń. Autorka nadała jej tradycyjny kształt i podzieliła na następujące rozdziały: Wstęp, Cel Pracy i Hipotezy Badawcze, Pacjenci, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Spis Rycin, Spis Tabel, Piśmiennictwo oraz Materiał Uzupełniający. Dodatkowo rozprawa zaopatrzona została w spis treści oraz wykaz ważniejszych skrótów stosowanych w pracy. Na początku rozprawy Doktorantka zamieściła listę publikacji obejmujących tematykę pracy doktorskiej, w których jest współautorem. Są wśród nich prace z listy filadelfijskiej (posiadające współczynnik oddziaływania IF). Doktorantka zamieściła także informację na temat projektów badawczych Narodowego Centrum Nauki, w ramach których badania były realizowane.

Autorka korzystała z 231 pozycji piśmiennictwa, autorów polskich i zagranicznych, które uszeregowane zostały zgodnie z kolejnością cytowania. Uzyskała zgodę na przeprowadzenie badań Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Praca jest napisana poprawnie pod względem językowym. Autorka nie uniknęła drobnych błędów merytorycznych, nomenklaturowych i edytorskich. Moje wątpliwości budzi niejednoznaczne nazewnictwo genów, mRNA i białek oraz miRNA i ich genów. Część oznaczeń prezentowanych w pracy wykonano (jak wynika z opisanej metody) w osoczu krwi (np. ocena poziomu miRNA), ale większość badań biochemicznych w surowicy (surowica to osocze pozbawione fibrynogenu). Tymczasem Doktorantka pisze, jakby materiałem do wszystkich badań było osocze.

Autorka pisze o poziomie aminotransferaz alaninowej i asparaginowej (ALT, AST) w osoczu, podczas gdy oznacza się ich aktywność (nie poziom) w surowicy.

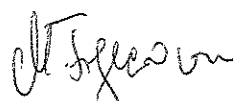
Doktorantka nie zawsze stosuje skróty wcześniej wprowadzone. Zamiast HCV pisze niekiedy „wirus HCV”. Trwałą odpowiedź wirusologiczną (SVR) nazywa czasem „kompletną eliminacją wirusa”, albo „trwała odpowiedzią na leczenie”.

Wniosek końcowy

Wymienione w niniejszej recenzji drobne uchybienia nie wpływają w istotny sposób na ocenę pracy. Stanowi ona zwartą logiczną całość. Sposób przedstawienia dostępnej wiedzy na

temat przewlekłego zapalenia wątroby typu C, roli miRNA w przebiegu zakażenia HCV, zakres przeprowadzonych badań oraz wszechstronność, z jaką dyskutowane zostały uzyskane rezultaty świadczą, iż Autorka rozprawy posiada ugruntowaną wiedzę na ten temat. Uważam, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, stąd wnoszę o dopuszczenie mgr Eweliny Marii Kałużnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto w opinii recenzenta praca mgr Eweliny Marii Kałużnej z uwagi na zakres wykonanych badań, szczegółowość i dojrzałość omówienia uzyskanych rezultatów zasługuje na wyróżnienie.



prof. dr hab. n. med.
Magdalena Figlerowicz
specjalista w dziedzinie pediatrii
i chorób zakaźnych, hepatolog
9042663