

30.07.2020

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Marii Kałużnej
pt. „Ekspresja i oddziaływanie wybranych mikro RNA z docelowymi mRNA
w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C.”

Praca doktorska mgr Eweliny Marii Kałużnej została wykonana w Instytucie Genetyki Człowieka PAN pod kierunkiem prof. dr med. Jerzego Nowaka. Na Promotora Pomocniczego w tej rozprawie powołana została dr hab. med. Marta Fichna z tej samej jednostki. Badania, których wyniki weszły w skład ocenianej pracy doktorskiej były finansowane w ramach trzech grantów Narodowego Centrum Nauki (OPUS, PRELUDIUM, ETIUDA) a doktorantka była kierownikiem dwóch ostatnich. Na uwagę zasługuje dorobek naukowy Doktorantki. Jest ona współautorem 15 prac, w sześciu pracach jest pierwszym autorem w siedmiu drugim i w dwóch trzecim. Prace te dotyczą zagadnień związanych z miRNA jak i z wirusowym zapaleniem wątroby. Kilka prac zostało opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, a sumaryczny współczynnik oddziaływania za ostatnie 5-lat (ang. 5-year Impact Factor, IF) dla tych prac wynosi 6,12 (według Web of Science). Indeks Hirscha mgr Eweliny Marii Kałużnej wynosi 3. Wszystkie te wskaźniki świadczą o dobrym poziomie prezentowanych prac stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora oraz są potwierdzeniem wagi prowadzonych badań, zarówno pod względem naukowym, jak i aplikacyjnym. Nie ulega wątpliwości, że interesująca z doświadczalnego punktu widzenia tematyka badawcza realizowana przez Doktorantkę zapewni w przyszłości podwyższenie Jej dotychczasowych wskaźników bibliometrycznych.

Przedstawiona do oceny rozprawa została napisana w języku polskim i zawarta na 158 stronach maszynopisu. Struktura ocenianej pracy doktorskiej jest standardowa i obejmuje istotne oraz wymagane części tj. teoretyczny Wstęp, precyzyjnie sformułowany Cel pracy, opisy Materiałów, Metod i Wyników, Dyskusję i Podsumowanie, Spis Literatury, a także Streszczenie w języku polskim i angielskim.

Tematyka rozprawy

Rozprawa doktorska odnosi się do intensywnie badanych w ostatnich dwudziestu latach zagadnień biologii molekularnej i medycyny translacyjnej, jakim są ekspresja, występowanie i funkcja mikro RNA, a także ich oddziaływanie z wybranymi mRNA oraz niektórymi białkami w komórkach prawidłowych i zmienionych. Doktorantka zainteresowała się tymi zagadnieniami w kontekście przewlekłego zapalenia wątroby wywołanego wirusem HCV.

Jak wiadomo wątroba pełni w organizmie wiele ważnych, złożonych funkcji związanych m.in. z wydzielaniem, detoksykacją, prawidłowym metabolizmem i magazynowaniem, dlatego też wszelkie zaburzenia w działaniu tego narządu mają znaczący wpływ na funkcjonowanie całego organizmu. Pomimo olbrzymiego potencjału regeneracyjnego pogorszenie czynności wątroby związane z wystąpieniem przewlekłej lub ostrej jej niewydolności stanowi istotny problem kliniczny. Przygotowany przez doktorantkę przegląd literaturowy oparty na najnowszych publikacjach naukowych w sposób wyczerpujący omawia charakterystykę przebiegu choroby, jej epidemiologię, możliwości terapii oraz możliwe konsekwencje ekonomiczne. Wszystkie zawarte we wstępie informacje są niezbędne do właściwej analizy przedstawionych w rozprawie wyników.

W drugiej części Wstępu autorka omawia rolę mikro RNA, czyli krótkich niekodujących białka cząsteczek RNA, które regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Odgrywają one istotną rolę w wielu procesach biologicznych, takich jak różnicowanie komórek, odpowiedź immunologiczna, apoptoza czy metabolizm. Są też bezpośrednio lub pośrednio zaangażowane w rozwój i przebieg wielu schorzeń. W przypadku chorób wątroby, oprócz zmian ekspresji miR-122, swoistego dla tego narządu, obserwuje się także zmiany profilu innych miRNA, których ekspresja zależy od etiologii schorzenia. Analiza profilu mikroRNA może mieć zatem wartość diagnostyczną i prognostyczną, a także może być w przyszłości przydatna w planowaniu terapii chorób wątroby. Doktorantka omówiła biogenezę oraz ogólny mechanizm działania miRNA, a także przykłady miRNA regulujące szlaki sygnałowe istotne dla przebiegu zakażenia HCV oraz rozwoju przewlekłego zapalenia wątroby typu C. Z przedstawionej analizy literatury wynika jasno, że zapalenie wątroby typu C jest poważnym i wciąż aktualnym problemem medycznym, który wymaga nowych efektywnych narzędzi badawczych i terapeutycznych. Wysiłek doktorantki przedstawiony i opisany w pracy doktorskiej miał pokazać, że krótkie, niekodujące białek kwasy rybonukleinowe zwane mikro RNA, mogą stanowić dobre narzędzie molekularne o zastosowaniu prognostycznym i predykcyjnym w WZWC (Tabela 3, str. 38).

W związku z tym autorka ukierunkowała swoje prace eksperymentalne na:

1. Analizę ekspresji wybranych krążących miRNA u ludzi z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby C.
2. Ocenę wpływu miRNA na funkcje hepatocytów i cykl życiowy HCV in vitro w ludzkich komórkach wątroby.
3. Ewaluację oddziaływań miRNA z mRNA oraz ich wpływu na przebieg choroby.

Te działania miały doprowadzić Doktorantkę do uzyskania odpowiedzi na szereg kluczowych pytań dotyczących charakterystyki i funkcji miRNA, a w szczególności:

1. Czy profil ekspresji miRNA jest charakterystyczny dla stopnia zakażenia HCV, poziomu wirusowego RNA (HCV RNA) oraz zakresu uszkodzenia wątroby?
2. Jeśli tak, to czy ekspresja wybranych miRNA może być wykorzystana jako znacznik prognostyczny i predykcyjny w wirusowym zapaleniu wątroby?
3. Jaki jest mechanizm regulacji przez mikro RNA takich procesów komórkowych jak proliferacja, cykl komórkowy i apoptoza?
4. Jaki jest mechanizm regulacji replikacji HCV in vitro?
5. Jaki jest charakter i wybiórczość oddziaływań miRNA z mRNA?

Główne rezultaty rozprawy

Autorka opisała (37 stron) doświadczenia, przedstawiła (29 stron) i przedyskutowała wyniki (9 stron) dotyczące analizy ekspresji miRNA w zapaleniu wątroby, jej korelacje z biochemicznymi parametrami schorzenia i poziomem wirerii, ekspresję oraz wpływ wybranych mikro RNA na proliferację, cykl komórkowy, apoptozę i replikację w linii komórkowej. Ważną część pracy stanowi analiza oddziaływań mikro RNA z wybranymi informacyjnymi RNA. Przeprowadzone doświadczenia, dobór metod i technik eksperymentalnych oraz interpretacja otrzymanych wyników wskazują jednoznacznie na duże kompetencje badawcze doktorantki i jej swobodne poruszanie się w tematyce objętej rozprawą. Jest pojedynczym autorem dwóch prac przeglądowych dotyczących mikro RNA w infekcji HCV, oraz współautorem trzech prac wieloautorskich dotyczących wirusowego zapalenia typu C.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską i analizie jej zawartości zidentyfikowałam następujące i, moim zdaniem, najważniejsze wyniki pracy:

1. Przeprowadzenie analizy ekspresji wybranych 179 miRNA osocza chorych z pWZW C wykazało zwiększenie (ponad 2x) ekspresji ok. 30% badanych mikroRNA (51/179). Oznacza to, że przewlekle zakażenie HCV istotnie zmienia profil ekspresji miRNA.

2. Z grupy miRNA o podwyższonej ekspresji u osób chorych z pWZW C do dalszych badań (walidacji) wybrano miR: 106-3p; 145-5p; 324-5p, 331-3p i 335-3p, chociaż nie wykazano istotnych różnic ekspresji tych miRNA u chorych odpowiadających i nieodpowiadających na leczenie przeciwwirusowe.
3. Wykazano niewielką dodatnią zależność ekspresji miR145-5p z poziomem aminotransferazy asparaginianowej (AST) i gammaglutamylu transpeptydazy (GGTP) oraz miR106-3p i miR331-3p z poziomem AST w osoczu chorych z pWZW C, oraz brak ich związku z poziomem HCV w osoczu.
4. Analizując różnicę ekspresji mikro RNA między chorymi z powodu pWZW C i oraz grupą kontrolną, do badań funkcjonalnych wybrano miR106b-3p, miR331-3p oraz miR335-3p.
5. Wykazano istotny wpływ miR: 106-3p, 331-3p i 335-3p na proliferację cykl komórkowy i apoptozę komórek. miR106-3p obniża proliferację, spowalnia cykl komórkowy i zmniejsza apoptozę. Przeciwnie, miR335-3p powoduje nasilenie apoptozy. miR331-3p przyspiesza cykl komórkowy i nasila apoptozę.

Uwagi do pracy

- Dla zrozumienia zagadnień związanych z patogennością HCV, konieczna jest dobra znajomość jego biologii molekularnej. We wstępie do pracy informacje na ten temat są szczątkowe,
- Jako ważny cel pracy doktorantka wskazała poznanie oddziaływań miRNA z mRNA, które decydują o specyfice translacji. Zatem byłoby wskazane aby pokazać złożoność HCV (budowa, IRES, obszary UTR, CRE),
- W dyskusji wyników autorka mogłaby próbować odpowiedzieć na pytanie dlaczego właśnie wyselekcjonowane mikro RNA funkcjonują w określony sposób, oraz czy i jakie różnice występują między nimi i dlaczego te zostały wyselekcjonowane
- Warto się zastanowić czy zamieszczanie spisu rycin i tabel osobno jako rozdział X i XII jest celowe,
- Piśmiennictwo (Rozdział XII) zawiera 231 pozycji. Część z przywołanych publikacji jest zbędna, gdyż nie są to prace oryginalne. Zapis niektórych referencji wymaga korekty np. poz. 70 (New England Journal of Medicine)

- W opisie badanych metod pojawił się żargon laboratoryjny, np. „worteksowano” .

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Eweliny Marii Kałużnej pt. ” Ekspresja i oddziaływanie wybranych mikro RNA z docelowymi mRNA w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka wykazała się dużą elokwencją badawczą, umiejętnością interpretacji i wyciągania wniosków z uzyskanych rezultatów. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę otwierają dalsze perspektywy badawcze i aplikacyjne, a przedłożona praca doktorska potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Moja ocena pracy jest bardzo pozytywna.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN o dopuszczenie mgr Eweliny Marii Kałużnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

