Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

ZAKŁAD BIOLOGII MEDYCZNEJ
al. Powstańców Wlkp. 72, MCD1
70-111 Szczecin, Poland
Tel: + 48 91466 1866; Fax: +48 91466 1788

Szczecin 05.05.2023 r.

dr hab. Agnieszka Kempińska-Podhorodecka
prof. PUM

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Beaty Kruk

pt. *„Wpływ wybranych polimorfizmów genetycznych na progresję włóknienia w cholestatycznych chorobach wątroby"*

promotor: prof. dr hab. Joanna Raszeja-Wyszomirska

Oceniana rozprawa doktorska przedstawia bardzo wartościowe wyniki badań o charakterze aplikacyjnym i podstawowym w zakresie chorób cholestatycznych wątroby, uzyskane dzięki umiejętnemu kontynuowaniu badań promotora pracy – Pani prof. dr hab. Joanny Raszeji-Wyszomirskiej. Ponadto, rozprawa doktorska Pani mgr Beaty Kruk stanowi doskonały przykład współpracy diagnosty laboratoryjnego ze znakomitym międzynarodowym zespołem klinicystów.

Etiologia cholestatycznych chorób wątroby pozostaje nadal nieznana. Etiopatogeneza niszczenia dróg żółciowych jest najprawdopodobniej wynikiem współdziałania wielu czynników, w tym genetycznych, środowiskowych, autoimmunologicznych, czy infekcyjnych. Polimorfizm genetyczny oznacza występowanie różnorodnych odmian danego genu, co

w konsekwencji może zwiększać ryzyko zachorowania, zaostrzać objawy i przebieg choroby. Dlatego słusznie Pani mgr Beata Kruk w swojej rozprawie doktorskiej założyła, że interakcja pomiędzy wybranymi wariantami genetycznymi, w tym wpływającymi na wystąpienie cholestazy, może odgrywać znaczącą rolę w procesie niszczenia miąższu wątroby u pacjentów z chorobami cholestatycznymi wątroby.

Ocena układu rozprawy doktorskiej i jej części składowych

Rozprawa doktorska Pani mgr Beaty Kruk przygotowana została jako cykl trzech prac doświadczalnych, opublikowanych w latach 2018, 2021 i 2022:

1. „*PNPLA3 p.I148M and TM6SF2 p.E167K variants do not predispose to liver injury in cholestatic liver diseases: A prospective analysis of 178 patients with PSC*"; **B. Kruk**, R. Liebe, M. Milkiewicz, E. Wunsch, J. Raszeja - Wyszomirska, F. Lammert, P. Milkiewicz, M. Krawczyk; PLoS One. 2018 r.; IF = 2.776 (MNiSW = 40 pkt);

2. „*MARC1 p.A165T variant is associated with decreased markers of liver injury and enhanced antioxidant capacity in autoimmune hepatitis*"; M. Janik, W. Smyk, **B. Kruk**, B. Szczepankiewicz, B. Górnicka, M. Lebiedzińska-Arciszewska, Y. Potes, I. Simões, S. Weber, F. Lammert, M. Więckowski, P. Milkiewicz, M. Krawczyk; Sci Rep. 2021; IF = 4.997 (MNiSW = 140 pkt);

3. „*A common variant in the hepatobiliary phospholipid transporter ABCB4 modulates liver injury in PBC but not in PSC: prospective analysis in 867 patients*"; **B. Kruk**, M. Milkiewicz, J. Raszeja-Wyszomirska, P. Milkiewicz, M. Krawczyk; Orphanet J Rare Dis. 2022; IF = 4.302 (MNiSW = 100 pkt).

Podkreślić należy, że wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o sumarycznej wartości współczynnika IF = 12.075 i 280 punktów MNiSW. W dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w jednym artykule występuje jako autor trzeci. Pierwsza publikacja ma 8 cytowań (1045 czytelników), druga była inspiracją dla 6 innych artykułów (2102 czytelników), a do trzeciej odwołała się jedna grupa naukowców (1141 czytelników). Zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami,

Doktorantka miała bardzo duży udział w tworzeniu tych publikacji (od 30 aż do 82% - średnio 60%). We wszystkich pracach recenzowanego cyklu, Pani mgr Beata Kruk była odpowiedzialna za koncepcję i metodologię badań, udział w gromadzeniu danych i realizację badań, nadzór nad realizacją badań, analizę i interpretację danych oraz opracowanie manuskryptu. Świadczy to o bardzo dużym zaangażowaniu i samodzielności Autorki. W trzech publikacjach z cyklu, wyniki badań Doktorantka zaprezentowała w postaci 12 tabel i 11 rycin. W niniejszych pracach, Doktorantka odwołała się, odpowiednio, do 23, 33 i 30 przypisów bibliograficznych.

Podobnie wysoką jakością jak publikacje odznacza się 76 stronnicowa rozprawa doktorska. Układ pracy Pani mgr Beaty Kruk jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań. Autorka potrafiła w bardzo przystępnej, syntetycznej formie przedstawić całość zagadnienia, naświetlić cele, opisać zastosowane metody i przebieg badań oraz podkreślić ważność uzyskanych wyników. Dokumentacja zawarta we *Wstępie* objęła 3 ryciny, w tym rysunki prezentujące polimorfizmy genetyczne związane z przewlekłymi chorobami wątroby i transporterami ABC oraz przykładowe wyniki genotypowania przy pomocy sond TaqMan. W pracy doktorskiej Pani mgr Beata Kruk zacytowała 36 publikacji, w tym odwoływała się do 6 artykułów zespołu, z którym aktywnie współpracuje. Dodatkowo, do pracy doktorskiej została załączona opinia komisji bioetycznej oraz oświadczenia współautorów trzech publikacji stanowiących cykl.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

We *Wstępie* rozprawy doktorskiej Autorka scharakteryzowała przewlekłe choroby wątroby, opisała przyczyny włóknienia wątroby, związek między predyspozycją genetyczną a czynnikami środowiskowymi sprzyjającymi wystąpieniu badanych jednostek chorobowych, określiła znaczenie wykrycia profibrotycznych wariantów genetycznych na podstawie wieloośrodkowych metaanaliz oraz uzasadniła rolę genetycznych czynników włóknienia wątroby u pacjentów z przewlekłymi chorobami tego narządu.

Doktorantka wytyczyła nadrzędny cel rozprawy doktorskiej, którym jest prospektywna analiza grupy pacjentów z pierwotnym stwardniającym zapaleniem dróg żółciowych (PSC), pierwotnym zapaleniem dróg żółciowych (PBC), autoimmunologicznym zapaleniem wątroby (AIH) oraz wariantami PSC-AIH i PBC-AIH, w kontekście wykrycia wariantów genetycznych regulujących postęp włóknienia wątroby. Doktorantka określiła także bardzo ważne cele szczegółowe, jak: (1) sprawdzenie, czy warianty PNPLA3 (rs738409) i TM6SF2 (rs58542926) mają niekorzystny wpływ na progresję włóknienia wątroby u chorych na PSC; (2) określenie

wpływu polimorfizmów genów: MARC1 (rs2642438), HSD17B13 (rs72613567), PNPLA3 (rs738409), TM6SF2 (rs58542926) i MBOAT7 (rs641738) na przebieg kliniczny choroby AIH oraz wariantów: AIH-PBC i AIH-PSC; (3) zbadanie wpływu polimorfizmu genu ABCB4 c.711A > T (p.I237I, rs2109505) na progresję włóknienia u pacjentów chorych na PBC i PSC.

Dążąc do osiągniecia postawionych celów, Doktorantka wykorzystała jako narzędzie badawcze PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR). W pierwszej kolejności badano udział polimorfizmu PNPLA3 (rs738409) i TM6SF2 (rs58542926) u 178 pacjentów chorych na PSC w wieku 17-75 lat. Do drugiego badania, w którym analizowano polimorfizmy genów: MARC1 (rs2642438), HSD17B13 (rs72613567), PNPLA3 (rs738409), TM6SF2 (rs58542926) i MBOAT7 (rs641738), włączono 313 chorych na AIH oraz 206 z wariantem AIH-PSC i 77 z AIH-PBC w wieku 18-84 lata. Trzecie badanie, oparte na badaniu wariantu ABCB4 c.711A > T (p.I237I, rs2109505) objęło aż 867 pacjentów, w tym 456 chorych na PBC w wieku 23-87 lat i 411 chorych na PSC w wieku 17-69 lat oraz dwie grupy kontrolne, tj. 468 osób. Należy podkreślić, że badanie tak dużej liczby pacjentów z chorobami rzadkimi wymagało od Doktorantki nawiązania współpracy z Pomorskim Uniwersytetem Medycznym w Szczecinie.

Wszystkie uzyskane i opisane przez Doktorantkę wyniki zostały skonfrontowane z danymi literaturowymi. Świadczy to o dojrzałości i samodzielności Doktorantki, która zaprezentowała bogatą wiedzę z zakresu nauk klinicznych i genetyki. Niewątpliwym osiągnięciem niniejszej rozprawy doktorskiej jest wykazanie, że: **1)** polimorfizmy genów PNPLA3 i TM6SF2 nie są związane z chorobą PBC/AIH, co podkreśla różnice w przebiegu uszkodzenia wątroby w stanach cholestatycznych, w porównaniu z metabolicznymi i wirusowymi chorobami wątroby; **2)** polimorfizm genu MARC1 ma działanie ochronne u pacjentów chorych na AIH i warianty AIH-PSC i AIH-PBC; **3)** polimorfizm genu MBOAT7 znacznie zwiększa ryzyko rozwoju raka wątrobowokomórkowego (HCC); **4)** wariant procholestatyczny genu ABCB4 c.711A>T moduluje uszkodzenie wątroby u chorych na PBC, ale nie u pacjentów z chorobą PSC; **5)** polimorfizm genu ABCB4 c.711A>T zwiększa ryzyko wystąpienia postępującego włóknienia wątroby.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr Beaty Kruk odpowiada warunkom art. 13 ***ustawy z dn. 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.*** Rozprawa ma charakter innowacyjny, a wyniki uzyskane przez Doktorantkę, w znaczny sposób poszerzają wiedzę dotyczącą patomechanizmu cholestatycznych chorób wątroby. Doktorantka potrafi korzystać z piśmiennictwa naukowego,

osiągnęła wysoki poziom wiedzy teoretycznej oraz uzyskała umiejętności samodzielnego planowania badania naukowego i rozwiazywania wybranych problemów badawczych, a także odpowiedniego przygotowania i organizacji badań naukowych. **W związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Beaty Kruk do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, biorąc pod uwagę całościowy dorobek Doktorantki, który sumarycznie wynosi 70.272 punktów IF i 1123 punktów MEiN, wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Kruk.

Agnieszka Kempińska-Podhorodecka