


Akceptuję


Prof. dr hab. n. med. Andrzej Mróz

Warszawa 02.11.2023

Zakład Patomorfologii

Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii Klinicznej

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego – Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej lek. med. Arkadiusza Urbanowicza pt” Ekspresja mikro-RNA w surowicy biorców wątroby, leczonych terapią bezinterferonową z powodu zakażenia HCV” przeprowadzonej na podstawie uchwały RDNM/D/492/2023 Rady Dyscypliny Nauk Medycznych z 21.06.2023 i nadesłanej dokumentacji.

Od wielu już lat przeszczepienie wątroby jest jedną z podstawowych metod leczenia schyłkowej niewydolności tego narządu. Długotrwały sukces zastosowania zabiegu związany jest z licznymi czynnikami, zarówno około zabiegowymi jak i zależnymi od pierwotnej przyczyny marskości oraz zastosowania właściwego leczenia immunosupresyjnego. Przewlekłe zakażenie wątroby wirusem typu C to obecnie główna przyczyna przewlekłego zapalenia wątroby, marskości i raka wątrobowokomórkowego. Ze względu na niekorzystną epidemiologię oraz nieuchronny rozwój zakażenia i zapalenia w wątrobie przeszczepionej, obecnie jednym z głównych ośrodków zainteresowania transplantologii jest właściwa kontrola i minimalizacja szkód związana z reinfekcją HCV. W ostatnich latach wprowadzenie do użytku terapii bezinterferonowych oznaczało niewątpliwie przełom w leczeniu zakażenia HCV, jednak tłący się proces zapalno-naprawczy powoduje włóknienie, rozwój guzków regeneracyjnych, rozrostowych i wreszcie raka wątrobowokomórkowego. Sekwencja ta jest niemal niema klinicznie, co utrudnia wykrycie nowotworu inwazyjnego na wczesnym etapie. Stosowany jest zatem monitoring w badaniach obrazowych i wykonywane biopsje wątroby przeszczepionej, trwają jednak poszukiwania prostych wskaźników diagnostycznych nadzorujących zaawansowanie włóknienia i nowotworzenie w wątrobie u biorców zakażonych HCV. Uważa się, że różnorodność genetyczna odgrywa istotną rolę w przebiegu

pooperacyjnym u HCV+ pacjentów, w tym profile małych regulatorowych mikro-RNA swoiste dla zakażenia HCV. Niektóre z nich mają już udokumentowane znaczenie, takie jak let7 i miR98, inne są obecnie poddawane intensywnym badaniom.

Właśnie takim badaniom poświęcił swój czas Doktorant, a ich wyniki podsumował w przedstawionej mi do recenzji pracy zatytułowanej " Ekspresja mikro-RNA w surowicy biorców wątroby leczonych terapią bezinterferonową z powodu zakażenia HCV". Celem pracy było oznaczanie profilu mikro-RNA swoistego dla zakażenia HCV, włóknienia wątroby oraz HCC u pacjentów po przeszczepieniu wątroby, w próbkach krwi badanych za pomocą technik molekularnych, przed i po zakończeniu leczenia DAA. Aby zweryfikować postulowane tezy wpływu różnorodności genetycznej na poziomie mikroRNA na przebieg zakażenia i nowotworzenia u biorców przeszczepu wątroby lek. Arkadiusz Urbanowicz zaprojektował bardzo ciekawe doświadczenie naukowe. Otóż spośród 120 pacjentów zakażonych HCV ze zweryfikowanym nawrotem w wątrobie przeszczepionej leczonych lekami bezpośrednimi (DAA) schematami zależnymi od podtypu genetycznego wirusa wyselekcjonował grupę 25 chorych z wywiadem HCC w wątrobie własnej oraz grupę kontrolną 23 chorych bez wywiadu raka wątrobowokomórkowego. W grupach tych oznaczano profil ekspresji wybranych na podstawie piśmiennictwa genów mikro-RNA (miRNA): miR-21, -26a, -122, -155, -214, -221, -222, -571, -let7a) za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy, w czasie rzeczywistym, w oparciu o odwrotną transkrypcję (qRT-PCR). Oznaczenia badanych genów dokonano w próbkach mikro-RNA wyizolowanego z surowic pacjentów, pobranych przed kwalifikacją do leczenia DAA oraz po upływie 6 miesięcy od jego zakończenia.

Przedstawiona mi do recenzji praca ma układ typowy i składa się ze 178 stron formatu A4 zawierających wstęp, założenia i cele pracy, metodykę wykonania doświadczenia, wyniki, dyskusję, 250 pozycji piśmiennictwa oraz spis treści, skrótów, 16 tabel, 35 rycin oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. We wstępie autor kompetentnie i całościowo przedstawia zagadnienie zakażenia wirusem HCV i wpływu genomu dawcy i biorcy na wyniki przeszczepiania wątroby w kontekście profilów mikroRNA i ich wpływu na trwałą odpowiedź wirusologiczną, leczenie immunosupresyjne, ryzyko infekcji, włóknienie i nowotworzenie. Lek. Arkadiusz Urbanowicz opisuje następnie kolejne etapy swoich badań począwszy od określenia profilów mikro RNA w surowicy pacjentów, poprzez ich amplifikację i kwantyfikację w reakcji odwrotnej transkryptazy aż po wyliczenie

relatywnej ekspresji badanego genu. Autor zastosował prawidłowe metody statystyczne do obliczeń związanych ze zmianami ekspresji badanych genów w zależności od leczenia i pojawienia się nawrotu HCV, włóknienia i raka wątrobowokomórkowego. W przeprowadzonych badaniach Kandydat ustalił, iż cztery spośród 9 badanych genów nie uległy amplifikacji (miR-122, -155, -222, and -571). W przypadku 5 genów mikro-RNA obserwowano amplifikację umożliwiającą detekcję ich ilości w surowicy pacjentów. Co więcej skuteczne leczenie przeciwwirusowe powoduje wzrost ekspresji wszystkich miRNA, podlegających detekcji, niezależnie od wywiadu HCC. Terapia DAA wiąże się z odmienną ekspresją miR-221, -26a, -21 oraz -let7a w zależności od obecności HCC w wywiadzie. Eradykacja HCV w grupie z wywiadem nowotworowym korelowała ze znacznym wzrostem poziomu ekspresji miR-221, -26a oraz -214, granicznego wzrostu dla -let7a oraz pozostaje niezmienna w przypadku miR-21. W grupie bez wywiadu nowotworowego leczenie przeciwwirusowe skutkuje wzrostem miR-214 i -21, granicznym wzrostem miR-221 oraz niezmienną ekspresją miR-let7a i -26a. W grupie bez wywiadu HCC zaś obserwowano wzrost ekspresji miR-214 niezależnie od nasilenia włóknienia, w przypadku miR-221 obserwowany wzrost ekspresji ma trend narastający wraz ze stopniem włóknienia. Eradykacja HCV w przypadku wystąpienia wznowy HCC wiąże się ze wzrostem ekspresji miRNA-221, -21 oraz -26, a także zmniejszeniem ekspresji miR-214 i -let7a (w porównaniu do grupy wolnej od wznowy HCC). Pomimo nieosiągnięcia znamienności statystycznej genami miRNA najlepiej dyskryminującymi wznowę HCC są miR-214 i miR-let7a.

Na podstawie otrzymanych wyników lek. Arkadiusz Urbanowicz wyciąga logiczne i ważne wnioski. Stwierdza, że oznaczanie profilu ekspresji wybranych genów miRNA w surowicach pacjentów może posłużyć jako potencjalny wskaźnik wznowy HCC, zwłaszcza odmienny kierunek zmiany ekspresji dla miR-214 i odmienny poziom ekspresji miR-let7a. Autor udowadnia także, iż wyleczenie HCV lekami z grupy DAA powoduje zmianę ekspresji badanych genów regulatorów a w przypadku miR-214, -221 oraz -let7a, dodatkowym czynnikiem modyfikującym ich ekspresję jest nasilenie włóknienia wątroby. Słusznie sugeruje zatem, iż mała inwazyjność pozyskania materiału biologicznego (pobranie krwi z żyły obwodowej) i obserwowana zmienność ekspresji badanych miRNA mogą zachęcać do dalszych badań mających na celu ocenę wartości predykcyjnej miR-214 i miR-let7a jako dodatkowego, potencjalnego wskaźnika ryzyka i nawrotu HCC.

Wyniki otrzymane przez kandydata wnoszą nową informację w dziedzinie transplantacji wątroby i mają realne szanse na poprawę opieki pooperacyjnej u HCV+ biorców wątroby. Takie, choćby potencjalne, konsekwencje przeprowadzonych przez lek. Arkadiusza Urbanowicza badań oceniam bardzo wysoko.

Należy podkreślić i docenić konsekwencje w zainteresowaniach naukowych Doktoranta, doskonały warsztat pracy i bardzo wysokie kwalifikacje w zasadzie we wszystkich działaniach obejmujących przygotowanie i wykonanie tego doświadczenia. Nie mam uwag merytorycznych dotyczących pracy, choć jako czytelnik i recenzent oczekiwałbym uproszczenia licznie reprezentowanych w pracy tabel. Praca jest ponadto zdecydowanie za długa, najwyższe kwalifikacje i profesjonalizm w danej dziedzinie powinny także obejmować umiejętność przekazywania wiedzy czytelnikom zazwyczaj mniej zorientowanym w badanej materii. Tego, w moim rozumieniu, autorowi zabrakło. W pracy odnalazłem pojedyncze błędy literowe i niekonsekwencje użytych określeń.

Powyższe drobne uwagi w żadnym razie nie umniejszają bardzo wysokiej oceny pracy Doktoranta. Przedstawione badanie to bardzo dobrze zaprojektowane, kompetentnie wykonane doświadczenie. Z przyjemnością zatem stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa "Ekspresja mikro-RNA w surowicy biorców wątroby, leczonych terapią bezinterferonową z powodu zakażenia HCV" spełnia warunki określone w art. 13 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 późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. Arkadiusza Urbanowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoką jakość przeprowadzonych badań i ich potencjalnie praktyczne zastosowanie w klinice mam zaszczyt wnioskować do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy.

*prof. dr hab. n. med. Andrzej Mróz
specjalista patomorfolog
NPWZ 4713818*

