

Akceptacja  
HJM

## OCENA

rozprawy doktorskiej na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

lekarza Arkadiusza Urbanowicza z Kliniki immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Tytuł rozprawy

**Ekspresja mikro-RNA w surowicy biorców wątroby, leczonych terapią bezinterferonową z powodu zakażenia HCV**

Promotor rozprawy: dr hab. n. med. Michał Ciszek

Promotor pomocniczy: dr n. med. Dominika Klimczak-Tomaniak

Rak wątrobowokomórkowy (HCC) stanowi trzecią na świecie przyczynę zgonu z powodu choroby nowotworowej, a w ponad 80% przypadków jego wystąpienie można powiązać z przewlekłymi zakażeniami wirusowymi, przy czym serologiczne wykładniki zakażenia HCV stwierdza się w ponad 50% przypadków HCC u osób rasy kaukaskiej. Mechanizmy prowadzące do powstania HCC są w zakażeniu HCV złożone i nie w pełni poznane, o czym obszernie pisze we wprowadzeniu Doktorant, ale nie ulega wątpliwości, że podstawowym czynnikiem ryzyka rozwoju raka jest zaawansowane włóknienie i dokonana marskość wątroby. Punktem wyjścia dla HCC są guzki regeneracyjne, ulegające metapłazji i w konsekwencji przemianie nowotworowej. To tłumaczy wieloogniskową naturę HCC, powstającego na bazie marskości wątroby. Roczne ryzyko zachorowania na HCC u osób z marskością wątroby typu C jest wysokie i wynosi od 1 do 4%. Starzenie się populacji zakażonej HCV i rozpoznawanie infekcji w stadium dokonanej marskości wątroby powoduje, że liczba przypadków HCC z roku na rok rośnie, i staje się priorytetowym wskazaniem do transplantacji wątroby. Dzieje się tak pomimo dostępnego od kilku lat, bardzo skutecznego leczenia doustnymi lekami bezpośrednio hamującymi replikację HCV (DAA). Bez wątpienia eradykacja HCV przed dokonaniem się nieodwracalnych zmian w miększu wątroby wyraźnie zmniejsza ryzyko zachorowania na HCC, ale w marskości wątroby ryzyko to pozostaje ciągle istotne, co wymaga prowadzenia u ozdrowieńców z zakażenia HCV stałego nadzoru onkologicznego. Doktorant podniósł również ciekawą kwestię możliwego zwiększonego ryzyka rozwoju HCC po zahamowaniu replikacji HCV w związku z nagłym zmniejszeniem się aktywności cytolitycznej komórek NK i zwiększoną liczbą regulatorowych limfocytów T CD25+, co ma prowadzić do pogorszenia nadzoru onkologicznego przez nieoczekiwane „uwolniony” od wirusa układ immunologiczny. Ta sugestia stała się przyczyną wahań w kwalifikowaniu potencjalnych biorców wątroby, zakażonych HCV, do terapii z użyciem DAA w

okresie przedtransplantacyjnym z obawy przed przemianą nowotworową guzków regeneracyjnych. Jeszcze większe wątpliwości dotyczyły biorców HCV-dodatnich z już dokonanym HCC, gdzie postulowano odroczenia leczenia DAA na okres po transplantacji z obawy przed powstaniem pozawątrobowych mikrosatelitów HCC i zwiększonym ryzykiem wznowy HCC po przeszczepieniu.

Doktorant podjął bardzo ważny i jednocześnie trudny temat identyfikacji biorców wątroby zagrożonych wznową HCC po transplantacji wątroby, leczonych DAA w okresie potransplantacyjnym. Do tego celu wykorzystał badanie ekspresji mikro-RNA u osób poddanych terapii bezinterferonowej, wśród których znalazło się 25 biorców z wywiadem dla HCC przed przeszczepieniem. Wiadomo, że ekspresja mi-RNA jest atrakcyjnym obszarem badań w onkologii, a szczególnym wyzwaniem jest diagnostyka wczesnego HCC, zwłaszcza w przypadku prawidłowych wartości alfa-fetoproteiny (AFP). Profile mikro-RNA mogą służyć jako potencjalne molekularne markery HCC, ponieważ powiązano zaburzoną ekspresję mi-RNA z proliferacją komórek nowotworowych, apoptozą, angiogenezą, tworzeniem przerzutów, angiogenezą, opornością na leki, autofagią i innymi zjawiskami opisanymi w tym schorzeniu. Wprawdzie nie jest zupełnie jasne, czy zaburzenia w profilu mi-RNA są przyczyną, czy konsekwencją rozwoju HCC, jednak badanie tych wariacji może przyczynić się do ustalenia związku pomiędzy nimi a HCV i HCC, co jest ważne zarówno z diagnostycznego jak i z terapeutycznego punktu widzenia.

Przedstawiona do recenzji rozprawa składa się ze 177 stron maszynopisu, podzielonego na dziesięć rozdziałów: krótki wstęp, cztery rozdziały prezentujące stan wiedzy na temat samego zakażenia HCV, raka wątrobowokomórkowego, leczenia przeciwwirusowego oraz zastosowania oznaczeń mikro-RNA w diagnostyce i HCV i HCC, oraz pięć rozdziałów bezpośrednio dotyczących dysertacji: metodyka badań włącznie z analizą statystyczną, wyniki, dyskusja, wnioski oraz piśmiennictwo. Ważnym niedopatrzeniem jest brak jasno sformułowanych celów pracy, które mogłyby korespondować z wyciągniętymi wnioskami. Cel pracy zasygnalizowany jest jedynie w streszczeniu. Niezbędnym ułatwieniem dla czytającego jest wykaz skrótów, w które obfituje tekst rozprawy. Użyteczne są ponadto streszczenia oraz spis tabel i rycin. Praca, z uwagi na opisy zawiłych patomechanizmów nowotworzenia w HCC oraz skomplikowanej metodologii badań miRNA i ich roli w hepatokarcynogenezie, jest niełatwa w czytaniu. Dużym wyzwaniem dla czytającego jest przebrnięcie przez 250 pozycji piśmiennictwa, w większości bardzo specjalistycznego.

W obszernym, liczącym 37 stron, wprowadzeniu dr Urbanowicz omawia z dużą znajomością literatury przedmiotu epidemiologię i naturalny przebieg zakażenia HCV, diagnostykę zakażenia, odpowiedź immunologiczną na struktury wirusa oraz przedstawia dość zawiłe hipotezy na temat działania onkogennego HCV. Część wprowadzenia poświęcona jest samemu rakowi

wątrobowokomórkowemu, w tym jego patogenezie, diagnostyce, zastosowaniu biomarkerów we wczesnej identyfikacji HCC oraz terapii tego nowotworu. Doktorant omawia różne sposoby leczenia chirurgicznego i systemowego HCC, a następnie poświęca kilka stron terapii anty-HCV, w szczególności z wykorzystaniem doustnych leków bezpośrednio działających (DAA). Interesujący jest wątek leczenia z wykorzystaniem DAA w relacji do HCC, zarówno przed jak i po przeszczepieniu wątroby, co Kandydat krytycznie omawia i wskazuje na możliwe ryzyko promocji nowotworu po eradykacji HCV u chorych z zaawansowanym włóknieniem wątroby. Część określoną przeze mnie jako wprowadzenie zamyka omówienie roli miRNA jako aktywnych graczy w patogenezie zakażenia HCV, w inicjacji powstawania i w progresji nowotworu, a także wykorzystania oznaczeń miRNA do oceny ryzyka i prognozy w HCV-dodatnim HCC.

W rozdziale 6. Kandydat przedstawia metodykę badania, mającego na celu określenie profilu mikro-RNA, który byłby swoisty dla zakażenia HCV, zaawansowanego włóknienia wątroby i dla HCC, a grupę badaną wyłoniono (w jaki sposób?) spośród 120 chorych po transplantacji wątroby z reaktywacją HCV, leczonych DAA. Właściwą grupę badaną stanowiło 25 pacjentów przeszczepionych z powodu HCV-dodatniej marskości wątroby z wywiadem HCC, a grupą kontrolną było 23 biorców wątroby bez danych dla HCC przed przeszczepieniem. Grupa badana i grupa kontrolna nie różniły się rozkładem płci, wieku i zaawansowania zakażenia HCV, które oceniono na podstawie biopsji wątroby. Oznaczenia miRNA dokonano w surowicy krwi pacjentów pobranej przed leczeniem DAA i po 6 miesiącach od zakończenia leczenia. Profil ekspresji 9 genów mikro-RNA oznaczono za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym w oparciu o odwrotną transkrypcję. Doktorant drobiazgowo opisał sposób izolacji RNA, amplifikacji oraz kwantyfikacji materiału genetycznego, podał sposób na obliczanie relatywnej ekspresji badanego genu i sposób weryfikacji skuteczności izolacji mi-RNA. Zapewne szczegóły metodologii są jasne jedynie dla wąskiej grupy biologów molekularnych, a klinicysta pozostaje pod wrażeniem posługiwania się przez Doktoranta tak wyrafinowanym warsztatem badawczym. Metody statystyczne zostały odpowiednio dobrane w zależności od tego, czy grupy były porównywane w sposób prosty (dla zmiennych jakościowych za pomocą testu Chi kwadrat i testu Fischera, dla zmiennych ciągłych za pomocą testu t Studenta lub testu sumy rang Wilcoxon), czy wielopoziomowo (za pomocą testu Cochran-Mantel-Haenszela). Badania normalności rozkładu dokonano przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Do porównania rozproszenia badanej cechy (wariancji) pomiędzy sesjami izolacji mi-RNA wykorzystano test Bartletta. Obliczeń dokonano przy użyciu systemu statystycznego SAS w wersji 9.4.

Wyniki przedstawione są na 54 stronach maszynopisu, głównie w postaci tabel i rycin. Doktorant scharakteryzował grupy kontrolną i badaną, nie wykazując istotnych różnic w zakresie podstawowych parametrów demograficznych i klinicznych, takich jak wiek, płeć, czas od

przeszczepienia wątroby, rozkład włóknienia i genotypów HCV. Następnie ocenił skuteczność leczenia p/wirusowego DAA w obu grupach, która była porównywalna. Doktorant wykazał detekcję 5 spośród 9 testowanych genów mi-RNA (miR-21, miR-26a, miR-214, miR-221, miR-let7a) oraz detekcję genu testowego Cell-miR-39-3p w każdej badanej próbce. Stwierdził, że skuteczne leczenie p/wirusowe spowodowało wzrost ekspresji wszystkich badanych miRNA, które uległy detekcji, niezależnie od wywiadu w kierunku HCC, ale wartości te zachowywały się odmiennie w zależności od obecności HCC przez przeszczepieniem. W grupie bez HCC po leczeniu DAA doszło do wzrostu poziomu ekspresji miR-221 (trend narastający wraz z nasileniem włóknienia), miR-26a oraz miR-214 (niezależnie od nasilenia włóknienia), do granicznego wzrostu miR-221 i niezmięionej ekspresji miR-let7a i miR-26a, natomiast w grupie w wywiadem nowotworowym doszło do znacząco wyższej ekspresji miR-221, miR-26a i miR-214. Ważną obserwacją było wykazanie, że wznowa HCC najlepiej koreluje ze zmniejszeniem ekspresji miR-214 oraz miR-let7a (choć zjawisko to nie osiągnęło istotności statystycznej).

Doktorant we wnioskach stwierdza, że oznaczanie profilu ekspresji wybranych mi-RNA w surowicach chorych zakażonych HCV bądź skutecznie wyleczonych z tego zakażenia może być użytecznym markerem wznowy HCC, co daje szansę na poprawę diagnostyki wczesnego stadium nowotworu. Wskazuje, że szczególnie przydatne może być badanie ekspresji miR-214 i miR-let7a, chociaż do tego wniosku należy podchodzić z bardzo dużą ostrożnością z uwagi na brak istotności statystycznej i małą liczebność badanych grup. Trzeba zaznaczyć, że doniesienia z innych ośrodków badawczych są często rozbieżne, choć pewne zależności powtarzają się; na ogół wskazuje się na istotną rolę takich miRNA jak onkosupresory miRNA-122 czy miRNA 34a, czy onkostymulatory miRNA-21 i miRNA-223. W przedstawionej do recenzji pracy na przykład miRNA-21 nie zmienił swojej ekspresji przed i po leczeniu DAA niezależnie od wywiadu nowotworowego. Doktorant wskazał, że z uwagi na ograniczenia finansowe i pracochłonność metod badawczych dokonał określonego wyboru miRNA, zawężając analizę do 9 genów i dwóch punktów czasowych badania. Zabrakło jasnego wyjaśnienia, dlaczego Doktorant dokonał wyboru akurat tych, a nie innych genów miRNA. W krytycznej analizie ograniczeń pracy Doktorant zwraca też uwagę na mnogość czynników, które mogłyby wpłynąć na ekspresję genów mi-RNA niezależnie od HCV i wznowy HCC, takich jak leczenie immunosupresyjne, leczenie epizodów ostrego odrzucania, inne zakażenia, itp. Tym niemniej jednak zachętą do dalszych badań jest wykazanie określonego trendu w ekspresji miRNA i łatwość pozyskania materiału do badania z krwi obwodowej.

Nieliczne uwagi krytyczne zawarłam w treści recenzji. Uwagi te nie umniejszają pozytywnej oceny pracy, która w moim odczuciu spełnia wymogi stawiane przed rozprawami doktorskimi, gdyż stanowi samodzielne i rzetelnie przeprowadzone rozwiązanie celu badawczego z przedstawieniem

ważnych z poznawczego i praktycznego punktu widzenia wniosków. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zmianami) 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. zmianami).

W oparciu o powyższe stawiam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lekarza Arkadiusz Urbanowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

*Marta Szwedka*

2041416

*Prof. dr hab. n. med.*  
*Marta Urbanowicz-Szwedka*  
internista  
specjalista chorób zakaźnych  
transplantolog



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
W SZCZECINIE  
Katedra Chorób Zakaźnych  
KLINIKA CHOROŃ ZAKAŹNYCH, HEPATOLOGII  
I TRANSPLANTACJI WĄTROBY  
71-455 Szczecin, ul. Arkońska 4  
tel. +48 91 813 0481, tel./fax +48 91 813 9456

Szczecin, 07.09.2023r.