



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

ZAKŁAD ANATOMII CZŁOWIEKA

dr hab. n. med. Małgorzata Witkowska-Zimny
Wydział Nauk o Zdrowiu
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5
02-004 Warszawa

Warszawa 12.12.2022r.

Dziekanat Wydziału Nauk o Zdrowiu

wpłynęło dnia 21.12.2022
RPM/12.155/2022

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Moniki Adamowicz

pt: "Wpływ leków stosowanych w terapii chorób cholestatycznych wątroby na poziom ekspresji wybranych miRNA"

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Adamowicz została opracowana zgodnie z wymaganiami określonymi w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z późniejszymi zmianami. Jej przedmiotem jest ocena wpływu leków powszechnie stosowanych w terapii rzadkich cholestatycznych chorób wątroby na ekspresję miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 i miR-506 w komórkowych modelach *in vitro*.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt: "Wpływ leków stosowanych w terapii chorób cholestatycznych wątroby na poziom ekspresji wybranych miRNA" stanowi zbiór trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych wzbogacony monografią będącą wprowadzeniem do rozprawy. Część pierwsza, licząca 86 stron obejmuje: objaśnienia skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, spis rycin i tabel. Część druga rozprawy stanowi cykl trzech tematycznie spójnych artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej w 2021 i 2022 roku. Łączny IF publikacji wynosi 16,463, a liczba punktów ministerialnych 340. Całość uzupełnia opis dorobku i osiągnięć naukowych doktorantki oraz zgody Komisji Bioetycznej na prowadzone badania.

Cykl trzech publikacji współautorstwa Pani mgr Moniki Adamowicz stanowiący zasadniczą część rozprawy doktorskiej dotyczy badań *in vitro* oceniających wpływ kwasu ursodeoksycholowego, 5-aminosalicylowego oraz indukowanego stanu zapalnego na poziom miR-155, a także miR-125b, miR-150, miR-346 i miR-506 w modelach komórkowych.

W publikacji nr 1: "Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis is Modulated by miR-155" zmniejszenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego PPAR α w komórkach pochodzących od pacjentów z pierwotnym zapaleniu dróg żółciowych (PBC) wykazywało związek z aktywacją ekspresji miR-155 i miR-21. PPAR α odgrywa znaczącą rolę w homeostazie kwasów żółciowych, oraz wykazuje ochronne działanie przeciwzapalne i antyapoptotyczne, co uzasadnia wybranie tego czynnika regulatorowego jako obiekt obserwacji. W hodowlach komórkowych *in vitro*, eksperymentalna nadekspresja miR-155 lub miR-21 prowadziła do spadku poziomu PPAR α w hepatocytach, podczas gdy w cholangiocytych taki efekt był obserwowany tylko dla miR-21. Zarówno pochodna kwasu chenodeoksycholowego, jak i kwas lithocholowy indukowały specyficzną dla danego typu komórek aktywację ekspresji miR-155 lub miR-21. W hepatocytach HepG2, w warunkach hodowli *in vitro*, indukowana przez lipopolisacharyd (LPS) ekspresja miR-155 była hamowana w obecności kwasu ursodeoksycholowego (UDCA) i była związana z aktywacją ekspresji PPAR α . Natomiast w komórkach przewodów żółciowych linii NHC ekspresja miR-21 była indukowana przez LPS, ale nie wpływała na poziom ekspresji PPAR α . Wyniki tych badań podkreślają nową biologiczną funkcję UDCA jako modulatora miR-155 w komórkach wątrobowych oraz przewodów żółciowych i wskazują na potencjalnie kluczowy wpływ obniżenia ekspresji miR-155 u pacjentów chorych na PBC.

Publikacja nr 2 pt: "5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: an *in vitro* study" dotyczy wpływu kwasu 5-aminosalicylowego (5-ASA), stosowanego w leczeniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i w podtrzymaniu remisji choroby u pacjentów z pierwotnym stwardniającym zapaleniem dróg żółciowych, na poziom ekspresji wybranych miRNA w linii komórek jelitowych Caco-2.

W niniejszej publikacji wykazano, że ekspresja miR-125b oraz miR-346 w komórkach Caco-2 uległa znacznemu spadkowi pod wpływem wyższego stężenia 5-ASA (1000 μ M). Jednocześnie, obniżonej ekspresji tych miRNA pod wpływem 5-ASA towarzyszyła indukcja ekspresji mRNA docelowego transkrypty receptora witaminy D (VDR). Badania relacji miRNA-VDR zostały potwierdzone analizami funkcjonalnymi z zastosowaniem przejściowej transfekcji. Nadekspresja zarówno miR-125b jak i miR-346 prowadziła do obniżenia ekspresji

VDR. Niniejsze wyniki są pionierskie i wskazują, że 5-ASA może indukować ekspresję VDR poprzez hamowanie wyżej wymienionych miRNA.

Autorzy wykazali znaczący spadek syntezy miR-150, miR-155 i miR-506 po ekspozycji komórek Caco-2 na dawki 500 μ M i 1000 μ M 5-ASA

Trzecia publikacja cyklu: "Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis" koncentruje się na wielofunkcyjnej cząsteczce miR-155, która może stanowić węzeł regulacyjny, łączący procesy zapalne i nowotworzenia. W okrężnicy wstępującej miR-155 hamował ekspresję SOCS1, co prowadziło do indukcji przekaźnika sygnału i aktywatora transkrypcji 3 (STAT-3) znanego z aktywacji pronowotworowych ścieżek prozapalnych. Natomiast, w okrężnicy esowatej pacjentów chorych na pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych i wrzodziejące zapalenie jelita grubego (PSC-UC), brak nadekspresji miR-155 aktywował szlak sygnalizacyjny IL-6/S1PR1 i zaburzał równowagę stosunku IL17/FOXP3, co może wzmacniać przewlekłe zapalenie jelita grubego. Opublikowane badania wykazały zmniejszenie ekspresji markera MSH2 nowotworu z wysoką niestabilnością mikrosatelitarną w okrężnicy wstępującej zarówno u pacjentów z PSC jak i PSC-UC, a markera MSH6 w PSC-UC i markera MLH1 u chorych na PSC. Patogeneza MSI-H u pacjentów z PSC w proksymalnej części okrężnicy była modulowana przez miR-155. Powyższe obserwacje zostały potwierdzone w badaniach funkcjonalnych *in vitro*. W zdrowych komórkach nabłonkowych okrężnicy linii NCM460D, podwyższony poziom miR-155 hamował ekspresję MLH1, MSH2 i MSH6, co było jednocześnie związane z indukcją ekspresji p53, kluczowego regulatora cyklu komórkowego, naprawy DNA i apoptozy. Odwrotny efekt zaobserwowano w komórkach gruczolakoraka HT-29, co wskazuje na to, że miR-155 skuteczniej tłumy gen p53 w komórkach nowotworowych. Autorzy wskazują na powiązania miR-155 z systemem naprawy błędnie sparowanych zasad DNA (MMR).

Wszystkie wymienione wyżej prace, które składają się na rozprawę doktorską ukazały się w bardzo dobrych czasopismach i podlegały już niezależnym recenzjom co stanowi znaczne ułatwienie w przygotowaniu recenzji i ocenie dorobku doktorantki. Należy podkreślić, że Doktorantka jest pierwszym ich autorem, ale nie został oceniony i podany jej wkład autorski w powstanie artykułów. W przypadku pracy nr 1 opublikowanej w Cell oraz pracy nr 3 z International Journal of Molecular Sciences wkład we współautorstwo można ocenić na podstawie umieszczonych w publikacjach sekcji: Author Contributions, ale praca nr 2 nie zawiera opisu zaangażowania poszczególnych współautorów w jej przygotowanie. W

mojej ocenie rozprawa doktorska powinna uwzględniać oświadczenia współautorów oceniających wkład autorski w powstanie poszczególnych prac składających się na cykl publikacji naukowych.

Bardzo dużą wartością przedłożonej do recenzji dysertacji jest monografia będąca wprowadzeniem do rozprawy, ale także opisem wyników jeszcze nieopublikowanych badań. Ta część pracy, będąca autorskim opracowaniem Doktorantki pokazuje zasób jej wiedzy, umiejętności przejrzystego przedstawienia prowadzonych eksperymentów, uzyskanych wyników, formułowania wniosków i posługiwania się piśmiennictwem naukowym. Jest ona napisana z ogromną starannością, piękną polszczyzną, bardzo logicznie i przystępnym językiem co sprawia że czyta się ją z prawdziwą przyjemnością.

Wstęp liczący 21 stron napisany jest w przejrzysty i czytelny sposób. Stanowi bez wątpienia ciekawe opracowanie doskonale wprowadzające w tematykę rozprawy doktorskiej i naukowych zainteresowań autorki. Doktorantka przedstawiła w nim syntetyczny i klarowny opis (i) autoimmunologicznych cholestatycznych chorób wątroby, (ii) najważniejszych leków stosowanych w ich leczeniu uwzględniając mechanizmy ich działania, (iii) roli i znaczenia miRNA włącznie z wyjaśnieniem stosowanej przy ich oznaczaniu nomenklatury.

Założenia i cel pracy są poprawne i jasno określone.

Rozdział Materiały i metody, obejmujący 12 stron zawiera spis i źródło pochodzenia wykorzystywanych komórek, metody hodowli komórkowych, jak też odczynników, materiałów niezbędnych do realizacji badań oraz opis metod analitycznych, biologii molekularnej, którymi posługiwała się Doktorantka. Imponuje szeroki wachlarz użytych metod z zakresu hodowli komórkowych, analiz biochemicznych i molekularnych. Informacje zawarte w tym rozdziale są wystarczające do zrozumienia zastosowanych procedur.

Część eksperymentalna pracy, opisana w rozdziale Wyniki, obejmuje 19 stron i poparta jest 9 rycinami. Prezentuje syntetyczny opis uzyskanych wyników w tym także tych jeszcze nieopublikowanych oraz zawiera odwołania do cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Rozdział Dyskusja (15 stron) został bardzo ciekawie napisany. Doktorantka przeprowadziła krytyczną i w pełni dojrzałą analizę otrzymanych wyników w świetle danych literaturowych z odwołaniem do cyklu prac oraz aktualnie prowadzonych badań klinicznych leków stosowanych w terapii autoimmunologicznych cholestatycznych chorób wątroby. Dojrzałość naukową Doktorantki potwierdzają sformułowane na końcu monografii

ograniczenia badań. Najważniejsze wnioski wynikające z tej pracy znajdują właściwe uzasadnienie w wynikach przeprowadzonych badań.

Piśmiennictwo uwzględnia 217 pozycji literaturowych.

Podsumowując, Pani mgr Monika Adamowicz w dysertacji podjęła ciekawy i ważny temat. Uzyskane wyniki mają nowatorski charakter i stanowią wartościowy materiał do kolejnych badań nie tylko uwzględniających tematykę miRNA, ale także charakterystykę patomechanizmów cholestatycznych chorób wątroby oraz szerokie spektrum działania leków przez regulację ścieżek sygnałowych miRNA-zależnych.

Należy podkreślić, że Doktorantka poza cyklem jest współautorką 33 prac, z których 2 są powiązane z tematyką rozprawy doktorskiej, a 31 wychodzi poza tematykę doktoratu. Sześć prac z dorobku Doktorantki zostało opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej, a ich łączna wartość IF wynosi 33,24.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawą doktorskim i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Moniki Adamowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę kompleksowość prowadzonych badań, obszerność i wartość merytoryczną uzyskanych wyników, oraz że zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o łącznym IF 16,463, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki o Zdrowiu Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Małgorzata Witkowska-Zimny