

dr hab. Marek Sawczuk, prof. US
Instytut Nauk o Kulturze Fizycznej
Uniwersytet Szczeciński

Szczecin, 28.12.2022 r.

Dziekanat Wydziału Nauk o Zdrowiu

wpłynęło dnia 30.12.2022
RPL/12532/2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Adamowicz

pt. „Wpływ leków stosowanych w terapii chorób cholestatycznych wątroby na poziom ekspresji wybranych miRNA”,

napisanej pod kierunkiem dr hab. n. zdr. Agnieszki Kempieńskiej-Podhorodeckiej

Podstawowe dane o kandydatce

Pani mgr Monika Adamowicz ukończyła w 2018 r. jednolite studia magisterskie na kierunku analityka medyczna realizowanym na Wydziale Lekarsko-Biotechnologicznym i Medycyny Laboratoryjnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, uzyskując prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego. W roku 2018 odbyła staż naukowy w zakładzie Biologii Medycznej PUM. Następnie, w latach 2019-2021 wykonywała w tymże Zakładzie badania molekularne w ramach projektów finansowanych z Funduszy Stymulacji Nauki PUM.

Zadeklarowana przez doktorantkę całkowita liczba prac/osiągnięć naukowych to 38 pozycji, w tym osiem publikacji posiadających punktację MEiN oraz sześć prac naukowych opublikowanych w czasopismach posiadających współczynniki wpływu Impact Factor. Pani mgr Monika Adamowicz była uczestniczką kilku konferencji i spotkań naukowych, w tym współautorką trzech wystąpień związanych z tematyką badań, które stanowią podstawę nadania stopnia naukowego doktora. Całkowita wartość punktowa współczynnika wpływu IF prac opublikowanych przez doktorantkę wynosi 33,24, natomiast łączna wartość punktacji MEiN to 805.

Ocena układu przedłożonej rozprawy doktorskiej i jej części składowych

Przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską pt. „Wpływ leków stosowanych w terapii chorób cholestatycznych wątroby na poziom ekspresji wybranych miRNA”, Pani mgr Monika Adamowicz oparła o cykl trzech opublikowanych artykułów naukowych oraz monografię. Wskazane przez doktorantkę publikacje, tj.:

1. **Adamowicz M**, Kempinska-Podhorodecka A, Abramczyk J, Banales JM, Milkiewicz P, Milkiewicz M. 2022. Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. Cells. IF: 7.666,
2. **Adamowicz M**, Milkiewicz P, Kempinska-Podhorodecka A. 2021. 5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: an in vitro study. Journal of Physiology and Pharmacology. Impact Factor: 2.589,
3. **Adamowicz M**, Stukan I, Milkiewicz P, Bialek A, Milkiewicz M, Kempinska-Podhorodecka A. 2022. Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis. International Journal of Molecular Sciences, IF: 6.208,

zostały opublikowane w czasopismach o wysokich współczynnikach wpływu (łączny IF=16,5, MEiN=340), są powiązane ze sobą tematycznie, a autorka w każdej z nich jest pierwszym autorem.

Założenia metodologiczne, wyniki badań oraz wnioski opisane w powyższych manuskryptach zostały przedstawione w monografii, skany publikacji stanowią zaś załączniki do rozprawy (10.1-10.3).

Monografia liczy łącznie 135 stron i zawiera spis 217 pozycji piśmiennictwa. Z formalnego punktu widzenia monografia ma układ charakterystyczny dla prac naukowych, w której występuje podział na rozdziały – w tym wypadku jest ich 10. Opracowanie to zawiera również tożsame streszczenia w języku polskim i angielskim, a także 3 strony indeksu skrótów/ skrótowców.

Monografia jest opracowaniem mającym na celu przedstawienie teoretycznego wstępu do dysertacji, precyzuje założenia metodologiczne i cele podjętych badań. Opisuje również metody, techniki i narzędzia badawcze, którymi posługiwała się doktorantka w trakcie prowadzenia analiz, przedstawia wyniki badań, zarówno te opublikowane w cyklu trzech artykułów, jak również rezultaty nieopublikowane. To także krytyczna dyskusja otrzymanych wyników, a także postawione na ich podstawie wnioski.

Pierwszym rozdziałem wydzielonym numerycznie jest **Wstęp** (strony 11-31), który podzielony został przez doktorantkę na 3 podrozdziały. W podrozdziale 1.1. pt. „Autoimmunologiczne cholestazy choroby wątroby” doktorantka przedstawia aspekty teoretyczne związane z etiopatogenezą, epidemiologią, objawami klinicznymi, diagnozowaniem pierwotnego zapalenia dróg żółciowych (PBC) oraz pierwotnego stwardniającego zapalenia dróg żółciowych (PSC). Podrozdział 1.2 opisuje wyczerpująco i rzeczowo wybrane i stosowane w leczeniu pacjentów z PBC i PSC leki, takie jak kwas ursodeoksycholowy (UDCA) oraz kwas 5-aminosalicylowy (5-ASA). W ostatnim podrozdziale wstępu Pani mgr Monika Adamowicz bardzo szczegółowo i skrupulatnie opisuje biogenezę miRNA, odnosi się do roli miRNA w regulacji funkcji immunologicznych, jak również wskazuje na znaczenie miRNA w procesie nowotworzenia. Ta część dysertacji jest bardzo ważnym elementem całości, gdyż pozwala czytelnikowi zapoznać się z tematyką rozprawy doktorskiej w taki sposób, aby nie pozostawiać u niego niedosytu wiedzy. Należy wyraźnie podkreślić, że ten fragment pracy doktorskiej jest popisem erudycji autorki i wskazuje na jej dogłębną wiedzę dotyczącą omawianych zagadnień.

Głównym celem dysertacji (**rozdział 2**) była funkcjonalna analiza wpływu UDCA i 5-ASA na ekspresję miRNA takich jak miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 i miR-506. Dodatkowo, doktorantka wyróżniła jeszcze 5 celów szczegółowych. Na pochwałę zasługuje również rozbudowanie założeń o 3 hipotezy badawcze, które z punktu widzenia metodologicznego, pomagają w późniejszym wnioskowaniu. Podsumowując tę część pracy należy stwierdzić, że założenia i cele pracy zostały poprawne i jasno określone i nie budzą wątpliwości.

W rozdziale 3 (strony 33-44) doktorantka skrupulatnie opisała wszystkie wykonane w trakcie prac laboratoryjnych procedury. Rozdział ten został podzielony na 9 podrozdziałów. Z pierwszego z nich (Linie komórkowe - 3.1.) czytelnik poznaje charakterystykę 4 linii komórkowych wykorzystanych przez autorkę w trakcie badań (linie ludzkich cholangiocytych NHC i H69, linia ludzkich hepatocytów HepG2, linia ludzkich enterocytopodobnych komórek Caco-2). W podrozdziale 3.2, doktorantka opisała szczegółowo sposób prowadzenia hodowli komórkowych. Następnie mgr Monika Adamowicz podała sposób oznaczenia aktywności cytotoksycznej UDCA i 5-ASA i wyselekcjonowania dawek leków o najniższym stopniu cytotoksyczności w stosunku do analizowanych linii komórkowych (3.3). Na podstawie analizy mikromacierzy opisanej w podrozdziale 3.4, do badań w niniejszej pracy wytypowano trzy miRNA, tj. miR-125b, miR-150, miR-155 (dwa pozostałe miRNA, tj. miR-346 i miR-506 wytypowano do badań na podstawie danych literaturowych i pozostałych badań własnych). W celu potwierdzenia relacji pomiędzy miRNA, a docelowym mRNA autorka przeprowadziła analizę przejściowej transfekcji miRNA, którą opisano w podrozdziale 3.5. W dalszej kolejności przedstawiono procedurę izolacji całkowitego RNA (3.6), reakcji odwrotnej transkrypcji mRNA oraz miRNA w celu

pozyskania stosownego cDNA. W przedostatnim podrozdziale (3.8) doktorantka opisała procedurę łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym. Finalne, w podrozdziale 3.9 przedstawiono sposób prowadzenia analiz statystycznych niezbędnych do właściwego wnioskowania statystycznego. Budzi uznanie mnogość wykorzystanych przez doktorantkę nowoczesnych technik i metod biologii molekularnej. Należy także pochwalić Panią mgr Monikę Adamowicz za skrupulatność i staranność opisu wszystkich procedur zastosowanych w trakcie prowadzenia analiz.

Rozdział 4 (strony 45-63), który podzielono na 10 podrozdziałów, przynosi bardzo rzeczową dokumentację uzyskanych w trakcie analiz wyników badań. Należy podkreślić, że opracowanie obszernego materiału zawierającego liczne zmienne poparte jest graficzną prezentacją w postaci 9 rycin, co znacząco zwiększa czytelność tej części pracy.

Podrozdziały 4.1-4.4 prezentują wyniki badań wpływu UDCA i 5-ASA na ekspresję wybranych miRNA w hodowlach komórkowych NHC, H69, HepG2 i Caco-2. Zaprezentowane rezultaty zostały wcześniej opublikowane w dwóch artykułach należących do wskazanego powyżej cyklu, tj. artykule „*Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis is Modulated by miR-155*” i *5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: an in vitro study*” oraz zawierają wyniki badań jeszcze nie opublikowanych. Głównym wnioskiem płynącym z tej części eksperymentu jest wykazanie, iż zarówno UDCA jak 5-ASA wpływają modulująco na ekspresję miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 i miR-506, zwiększając jak również zmniejszając poziom ekspresji wybranych do analizy miRNA w różnych typach komórek.

W podrozdziale 4.5 przedstawiono wyniki analiz wpływu indukowanego przez lipopolisacharyd (LPS) stanu zapalnego na ekspresję wybranych miRNA w liniach komórek Caco-2, NHC, H69 i HepG2. Wyniki opracowano na podstawie publikacji „*Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155*” oraz „*Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis*”, a także badań dotychczas niepublikowanych. Wykazano, że LPS w odmienny sposób wpływał na ekspresję miRNA w wybranych liniach komórkowych (np. w komórkach NHC wykazano spadek ekspresji miR-346, w komórkach H69 wzrost ekspresji miR-155 oraz spadek ekspresji miR-506, a w komórkach HepG2 wzrost poziomu ekspresji miR-155 po stymulacji LPS).

W podrozdziale 4.6 przedstawiono wyniki analizy ekspresji genów *TNFA* oraz *ZC3H12A* w liniach komórek Caco-2, NHC, H69 i HepG2 w celu potwierdzenia, czy w badanych liniach komórkowych doszło do zaindukowania stanu zapalnego pod wpływem podanego LPS. Zaobserwowano wzrost ekspresji zarówno *TNFA* jak i *ZC3H12A* w komórkach H69 oraz NHC. Podwyższony poziom mRNA genu *ZC3H12A* wykazały również hepatocyty HepG2.

Podrozdziały 4.7-4.8 przynoszą opis wyników analizy wpływu UDCA i 5-ASA na ekspresję wybranych miRNA (miR-155 i miR-346 i miR-506) w komórkach NHC i H69 z zaindukowanym stanem zapalnym. Autorka wykazała, że komórki NHC inkubowane z UDCA i 5-ASA posiadały obniżony profil ekspresji dla miR-155 i miR-346, w komórkach H69 stwierdzono obniżenie poziomu ekspresji tylko dla miR-155.

W tytule podrozdziału 4.9 doktorantka zadeklarowała przedstawienie wyników analizy wpływu UDCA i 5-ASA na ekspresję miR-155 i miR-506 w komórkach HepG2 z zaindukowanym stanem zapalnym. Dla miR-155 stwierdzono obniżenie poziomu ekspresji po ekspozycji na UDCA i 5-ASA. Zastanawia natomiast przedstawienie wyników dla miR-125b. Wcześniejszy wybór miRNA nie wskazywał bowiem na miR-125b (wyniki badań zaprezentowane w podrozdziale 4.5, strony 53-54 oraz podrozdział 4.6, strona 55, ostatnie zdanie „*Do dalszych analiz wybrano podzbiór miRNA, których ekspresja zmieniła się pod wpływem LPS*”).

Wyniki przejściowej transfekcji wybranych miRNA w komórkach Caco-2, HepG2 i NHC przedstawiono w ostatnim podrozdziale, 4.10. Wyniki opracowano na podstawie publikacji "5-aminosalicylic acid inhibits the expression of oncomiRs and pro-inflammatory microRNAs: an in vitro study" oraz "Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155". Analizę wykonano w celu potwierdzenia związku pomiędzy wybranymi miRNA, a docelowymi transkryptami mRNA. Stwierdzono, że indukcja miR-125b prowadziła do obniżenia poziomu ekspresji docelowego transkryptu genu *VDR*, nadekspresja miR-155 wiązała się z obniżeniem ekspresji genu *SOCS1*. Stwierdzono również, że inhibicja ekspresji miR-155 zwiększyła poziom mRNA genu *SOCS1* i wiązała się również ze wzrostem ekspresji genu *S1PR1*. Przejściową transfekcję przeprowadzono również na liniach komórkowych HepG2 i NHC w celu potwierdzenia zależności pomiędzy miR-155, a genem *PPARA* kodującym PPAR α . Nadekspresja miR-155 prowadziła do spadku poziomu PPAR α w komórkach HepG2, lecz nie w linii NHC.

Wszystkie uzyskane i opisane przez autorkę dysertacji wyniki zostały skonfrontowane z danym literaturowymi w **rozdziale 5 - Dyskusja** (strony 64-78). Rozdział ten napisany jest w sposób przejrzysty i świadczy o dojrzałości i samodzielności doktorantki, która wykazała się bogatą wiedzą z zakresu nauk klinicznych, farmakologii, biochemii, biologii molekularnej. Należy stwierdzić z całą stanowczością, że autorka posiada umiejętność posługiwania się zdobytą wiedzą, którą w pełni wykorzystała do oceny swoich wyników i przedyskutowania ich z rezultatami innych grup badawczych. Następnie doktorantka postawiła **3 wnioski (rozdział 6)**, które są prawidłowo sformułowane i nie budzą zastrzeżeń. Wynika z nich, że:

1. możliwość modulacji wybranych miRNA, tj, miR-125b, miR-150, miR-155, miR-346 i miR-506 przez UDCA i 5-ASA daje potencjalną możliwość regulacji ekspresji docelowych transkryptów mRNA, które mają kluczowe znaczenie w patogenezie cholestatycznych chorób wątroby,
2. UDCA hamując ekspresję miR-155 może zapobiegać obniżeniu ekspresji PPAR α , co poszerza wskazania dla leku stosowanego w leczeniu pierwotnego zapalenia dróg żółciowych,
3. wykorzystanie modulującego efektu 5-ASA na sygnalizację miR-155 może być potencjalną strategią w prewencji raka jelita grubego wykazującego wysoki stopień niestabilności mikrosatelitarnej u pacjentów chorych na stwardniające zapalenie dróg żółciowych.

Powoływanie się na literaturę oraz sporządzenie spisu literatury (**rozdział 7**).

W pracy doktorantka przyjęła system vancouver (lub systemem autor-numer), jako sposób podawania odwołań do publikacji źródłowych. Oznacza to, że powołanie na informacje zawarte w źródle zwieńczone zostało odsyłaczem cyfrowym do cytowanej publikacji, a bibliografię sporządzono zgodnie z kolejnością cytowania w tekście. System ten jest stosowany przez autorkę pracy prawidłowo. Spis literatury zawiera 217 pozycji ze zdecydowaną przewagą tytułów anglojęzycznych. Przygotowany jest starannie, a doktorantka konsekwentnie stosuje raz przyjęty sposób zapisu publikacji źródłowych.

Rozdziały 8-10 to odpowiednio 1 strona spisu tabel, 1 strona spisu rycin oraz 1 strona spisu załączników wraz z załącznikami, które stanowią skany publikacji, na których autorka oparła swoją rozprawę doktorską, opis dorobku oraz osiągnięć naukowych doktorantki oraz skany stosownych zgód Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań przedstawionych w dysertacji.

Poniżej przedstawiono nieliczne krytyczne uwagi odnośnie przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Adamowicz

Przedłożona do oceny dysertacja zawiera wyniki badań, które zostały opublikowane w trzech współautorskich artykułach naukowych. Zgodnie z przyjętym zwyczajem, za każdym razem, gdy rozprawę doktorską stanowi samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, doktorant powinien

przedstawić dokumenty, które pozwalają na ocenę jego indywidualnego wkładu w powstanie takiej pracy.

Dwa z trzech artykułów, tj.

1. **Adamowicz M**, Kempinska-Podhorodecka A, Abramczyk J, Banales JM, Milkiewicz P, Milkiewicz M. 2022. Suppression of Hepatic PPAR α in Primary Biliary Cholangitis Is Modulated by miR-155. *Cells*. IF: 7.666,
2. **Adamowicz M**, Stukan I, Milkiewicz P, Bialek A, Milkiewicz M, Kempinska-Podhorodecka A. 2022. Modulation of Mismatch Repair and the SOCS1/p53 Axis by microRNA-155 in the Colon of Patients with Primary Sclerosing Cholangitis. *International Journal of Molecular Sciences*, IF: 6.208,

zawierają zadeklarowane przez autorów wkłady w powstanie powyższych publikacji w sekcjach „Author Contributions”, informacji takiej nie ma jednak w przypadku trzeciej publikacji. Można również pośrednio dowiedzieć się za jakie działania odpowiedzialna była autorka dysertacji na podstawie informacji zawartych przez nią w monografii. Jednakże, w celu ułatwienia oceny dysertacji, Pani mgr Monika Adamowicz powinna przedłożyć stosowne oświadczenia, które w sposób jednoznaczny określiłyby wkład poszczególnych autorów, a w szczególności doktorantki, w powstanie każdego z trzech artykułów, które to składają się na cykl publikacji naukowych, na których oparto przedłożoną do oceny rozprawę doktorską.

Drobne błędy i przejęzyczenia:

- Monografia zaczyna się „Objaśnieniem skrótów” użytych w pracy. Jest to rozwiązanie często stosowane w opracowaniach naukowych z dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu. W tym miejscu należy jednocześnie zwrócić uwagę autorce, że wspomniane „Objaśnienie skrótów” jest to de facto wykazem skrótowców. Przytaczając za Słownikiem Języka Polskiego PWN – „skrótów nie są wyrazami, lecz tylko sposobem zapisu wyrazów (lub ich połączeń), co można poznać po tym, że nie występują w języku mówionym, natomiast skrótowce to wyrazy pochodne (powstałe ze skrócenia wielowyrzowej nazwy, funkcjonujące nie tylko w piśmie, lecz także w mowie”. W związku z tym skrótowce wymawiane są jako skrótowce, nie jako pełne nazwy (np. PPAR), natomiast skrótów wymawiamy jako całe słowa (np. np).
- Nazwy genów ludzkich zapisujemy wielką literą i pismem pochylonym - należało by to ujednoczyć w pracy, gdyż w pracy reguła ta nie zawsze jest dochowana (np. strona 30, *MAD2L1*, *CUL5*; strona 55: *TNFA*, *ZC3H12A*).
- Niekiedy brak wytłumaczenia użytych w pracy skrótów/skrótowców, np. strona 18: PI3K, AKT, Nrf2; strona 25: TRBP, PACT; strona 26: *TYK2*, *STAT4*, *SP1B*, *PTKCB*, *ARID3A*, *IRF5*; strona 29: *CCND1*, *CCNE2* i *HDAC1*, *APC*, *CTNNB1*; strona 30: *MAD2L1*, *CUL5*, *TWIST1*, *ZEB2*, *ADAM17*; strona 31: *TIAM1*, *SNAIL*, *GL1*; strona 76-77: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*.
- Strona 6: ALP, Alanine phosphatase (Fosfataza zasadowa), powinno być – Alkaline phosphatase.
- Strona 24, wers 19: Dorsha, powinno być Drosha.
- Strona 53: cytuję „W cholangiocytach z linii NHC, wykazano **spadek miR-346** (13% redukcji, $p=0,0001$ w stosunku do kontroli) (Rycina 10B), a w komórkach H69 **wzrost miR-155** (24% wzrost, $p=0,009$) oraz **spadek miR-506** (32% redukcja, $p=0,007$) w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 10C). W linii hepatocytów HepG2 po stymulacji LPS zaobserwowano **wzrost miR-155** (68-krotny wzrost, $p=0,01$ w stosunku do kontroli) (Rycina 10D)”. Dla pogrubionych fragmentów tekstu, powinno się zastosować sformułowanie „spadek/wzrost ekspresji...”.

- Strona 63: autorka wskazuje na wykorzystanie Figur (np. Figura 1B, Figura 3B, Figura 5A) co prawdopodobnie wiąże się z bezpośrednim tłumaczeniem z języka angielskiego „Figure” - powinno być „rycin” bądź „wykresów”.
- strona 67: cytuję: „Jednocześnie zaobserwowano obniżenie receptora witaminy D”, czy nie powinno być „Jednocześnie zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji genu receptora witaminy D”?

Podsumowując należy przyznać, że nieliczne uwagi zawarte w recenzji, które mogą mieć charakter redakcyjny lub przedstawiają subiektywny punkt widzenia recenzenta, nie umniejszą w niczym wysokiej wartości merytorycznej przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej mgr Moniki Adamowicz. Należy podkreślić, że praca ma bez wątpienia nowatorski charakter, a wyniki uzyskane przez doktorantkę w znaczący sposób poszerzają wiedzę dotyczącą modulującego wpływu UDCA i 5-ASA na ekspresję wybranych cząsteczek miRNA, co może mieć niebagatelne znaczenie w dokładnym zrozumieniu patomechanizmu cholestatycznych chorób wątroby takich jak PBC i PSC. Uzyskane wyniki dają również doskonałą podstawę do dalszych badań, mających na celu zidentyfikowanie pełnej zależności między wytypowanymi w pracy miRNA, ich docelowymi genami oraz UDCA i 5-ASA. Odpowiednio określone cele badawcze, szczegółowo zaplanowane i drobiazgowo przeprowadzone badania, prawidłowa interpretacja wyników, a także wysnute wnioski, wskazują na bardzo dużą znajomość tematyki badawczej i świadczą o tym, że doktorantka może być uznana za dojrzałego pracownika naukowego. Uważam, że przedstawiona do recenzji praca mgr Moniki Adamowicz w pełni spełnia wszystkie wymogi rozprawy doktorskiej określone w Ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki o Zdrowiu Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie mgr Moniki Adamowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, ze względu na wysoką wartość uzyskanych wyników, możliwości ich klinicznego zastosowania oraz opublikowanie rezultatów rozprawy doktorskiej w renomowanych czasopiśmie o wysokich współczynnikach wpływu, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Moniki Adamowicz.



Marek Sawczuk