



Recenzja
rozprawy doktorskiej pt.:
„Ekspresja enzymów metabolizujących leki w przebiegu HCV”
Autor: mgr Łukasz Skalski

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) od kilkudziesięciu lat stanowi wyzwanie dla medycyny, a podkreśleniem wagi problemu było przyznanie Nagrody Nobla w 2020 r. w dziedzinie medycyny trzem badaczom tj. Harvey J. Alter, Michael Houghton i Charles M. Rice za zidentyfikowanie tego wirusa. Szacuje się, że na całym świecie 71 milionów ludzi ma przewlekłe zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C, a każdego roku dochodzi do około 1,5 miliona nowych zakażeń. WHO oszacowała, że w 2019 roku około 290 000 osób zmarło z powodu wirusowego zapalenia wątroby typu C, głównie z powodu marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego (pierwotnego raka wątroby), m. in. dlatego, że obecnie nie ma skutecznej szczepionki przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu C (WHO Guidance on hepatitis C (HCV), 2022). Uważa się, że w krajach rozwiniętych, w tym również w Polsce, liczba zgonów spowodowanych WZW typu C zaczęła obecnie przekraczać liczbę zgonów będących skutkiem infekcji HBV czy HIV. Należy jednak podkreślić do większości wykrywanych obecnie w Europie Zachodniej przypadków zakażenia HCV dochodzi wśród osób przyjmujących substancje psychoaktywne (odurzające=narkotyki) drogą dożylną, natomiast w Polsce dominują zakażenia w jednostkach ochrony zdrowia, stanowiące ok. 80% przypadków zakażeń, a w większości jest to pokłosie masowych zakażeń tym wirusem, do których dochodziło w latach 70 - pacjentów zakażano przetaczając im krew (Zakrzewska et al. 2019). Należy jednak podkreślić że, od kilkunastu lat dokonał się w terapii leczenia WZW typu C olbrzymi postęp, ponieważ chorobę tę można wyleczyć u ogromnej większości chorych. Wprowadzone bowiem od 2013 roku małocząsteczkowe leki działające jako inhibitory odpowiednich proteaz (np. NS3) czy polimeraz (np. NS5B) spełniające paradygmat terapii celowanej poprzez blokowanie funkcji aparatu replikacyjnego wirusa C pozwalają skutecznie hamować namnażanie się tego wirusa

w organizmie chorego (Reardon 2013, Santander Ballestín et al. 2021). W Polsce od 1 listopada 2015 r. do leczenia HCV w Polsce stosuje się taką farmakoterapię wykazującą bardzo wysoką skuteczność wyleczenia. Blisko 80 proc. chorych w Polsce ma genotyp 1 (odmiana 1b), którzy w większości z powodzeniem poddają się terapii lekami dostępnymi w Polsce (Zarębska-Michaluk et al. 2022). Tym samym terapia ta pozwala uniknąć poważnych konsekwencji zdrowotnych choroby HCV, wysokich kosztów leczenia jej powikłań oraz rozłożonych na wiele lat kosztów pośrednich jako poważnych konsekwencji zdrowotnych choroby. Jednakże, pomimo ogólnej bardzo wysokiej skuteczności takiego leczenia farmakologicznego zidentyfikowano występowanie w naszym kraju pewnych niekorzystnych czynników, do których należą: płeć męska, infekcja genotypem 3 czy występowanie marskości wątroby u chorych, które znacznie zmniejszają szanse na odpowiedź wirusologiczną (Brzdęk et al. 2023).

Wiadomo, że marskość wątroby należy do tych czynników, które mają istny wpływ na funkcjonowanie tego narządu, co może skutkować zmianami metabolizmu tych leków oraz wpływać istotnie na ich eliminację z organizmu pacjenta, a tym samym wpływać na skuteczność prowadzonej terapii. Na tym tle poszukiwania możliwości zoptymalizowania terapii lekami anty-HCV poprzez określenie ekspresji genów kodujących enzymy włączonych w metabolizm tych leków tak na poziomie mRNA jak i białka oraz określenie związku pomiędzy wybranymi wariantami genetycznymi a ekspresją ww. genów w tkance wątrobowej (bioptaty wątroby) pobranej od pacjentów chorych na zapalenie wątroby typu C, zakwalifikowanych do przeszczepienia tego organu wobec odpowiedniej tkanki kontrolnej, było celowe i merytorycznie uzasadnione.

Układ pracy przedstawionej monografii jest typowy dla prac eksperymentalnych. Materiał recenzowanej pracy doktorskiej Autor zamieścił w 13 rozdziałach na 149 stronach numerowanych, dodatkowo na końcu załączając kopię pracy: „Drozdziak, M., Lapczuk-Romanska, J., Wenzel, C., **Skalski, L.**, Szeląg-Pieniek, S., Post, M., Parus, A., Syczewska, M., Kurzawski, M., & Oswald, S. (2023). Protein Abundance of Drug Metabolizing Enzymes in Human Hepatitis C Livers. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4543. <https://doi.org/10.3390/ijms24054543>”.

W rozdziale pierwszym (str. 8-50) przedstawiono wstęp, w którym zawarto podstawowe informacje związane metabolizmem leków zachodzących w wątrobie oraz opisano współczesne poglądy na temat farmakoterapii WZW typu C (HCV). Szerzej w tym aspekcie Autor przedstawił udział wybranych enzymów włączonych w metabolizm leków, biorąc pod uwagę reakcje metaboliczne zaliczane do I i II fazy, wspominając także o

czynnikach transportujących leki w tej tkance, bez jednak szerszego rozwinięcia tego tematu. Ponadto w tej części pracy omówił rolę interferonów w leczeniu HCV, ze szczególnym uwzględnieniem nowych strategii leczenia schorzenia wywoływanego przez HCV, przedstawiając wybrane inhibitory proteazy NS3/4A czy polimerazy NS5B jako nowoczesne leki stosowane w leczeniu WZW typu C, zaliczane do tzw. DAA (direct antiviral agents). W kolejnych rozdziałach przedstawiono cel pracy (str. 51), szczegółowo omawiając metodykę badań wraz ze stosowanymi testami (RT-PCR, analiza na poziomie białka – LC-MC/MS, genotypowanie) oraz metody stosowane podczas analizy statystycznej (str. 52-63). Wyniki przeprowadzonych doświadczeń umieszczono na rycinach (Ryciny 1-71) oraz tabelach (Tabele 8-10), zamieszczając ich szczegółową analizę w rozdziale zatytułowanym „Wyniki” (str. 650-100). Otrzymane dane dogłębnie przedyskutowano w rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” (str. 101-112). Spis cytowanych prac (str. 118-132) obejmuje 194 pozycje piśmiennictwa (z tego 114 z ostatnich 10 lat) ściśle związane z tematyką przedstawianą tak we wstępie jak i umiejętnie wykorzystane w dyskusji.

Należy podkreślić, że zastosowane metody do określenia ekspresji wybranych genów na poziomie mRNA (RT-PCR) (tj. CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7, UGT2B15), zawartości białka enzymatycznego dla tychże genów (metoda LC MS/MS) oraz genotypowanie (przy pomocy odpowiednich sond TaqMan) przeprowadzone dla wybranych wariantów (polimorfizmów) poszczególnych izoenzymów CYP 450 (tj. CYP2C19, CYP2D6, CYP3A5) były właściwe i zgodne z aktualnymi standardami wykonywania takich badań.

Na podstawie otrzymanych wyników Autor sformułował pięć wniosków (str. 113), stwierdzając, iż „Stężenia mRNA i białek dla większości enzymów metabolizujących leki u pacjentów z niewydolnością wątroby w przebiegu HCV były obniżone (...)”, a „Obserwowane zmiany stężenia białek enzymów metabolizujących leki były zależne od stopnia niewydolności narządu (...)”, jednocześnie podkreślając ich „korelację z ekspresją kodujących je genów na poziomie mRNA”. Stwierdził także, że „ Czynniki genetyczne mogą mieć wpływ na zawartość mRNA i białka enzymów CYP2D6, CYP3A5 i CYP2C19 (...)”. Ostatni wniosek jest raczej wnioskiem podsumowującym czy też konkluzją wskazując, że „(...)zarówno zmiany spowodowane zaburzeniem funkcji wątroby w przebiegu infekcji HCV, jak i polimorfizm genetyczny mogą być przyczyną zmienionej aktywności enzymów metabolizujących leki, a w konsekwencji zmienionej farmakokinetyki wielu leków”. W pracy zamieszczono również streszczenie w języku polskim (str. 114-115) i angielskim (str. 116-117).

Dysertacja ta wyróżnia się nie tylko dobrze opracowanym, opartym na aktualnym, światowym piśmiennictwie wstępie, ale również odniesieniem otrzymanych wyników do uzyskanych przez innych autorów przede wszystkim z badaniami u pacjentów z marskością wątroby nie tylko związanych z HCV (z uwaga na względnie małą liczbę doniesień w tym względzie), ale powstałych na skutek występowania innych przyczyn schorzeń wątroby. Problematyka, którą porusza Autor w dyskusji nie ogranicza się tylko do samego potencjału metabolicznego u pacjentów z marskością wywołaną HCV, ale i możliwym oddziaływaniem leków obecnie stosowanych w leczeniu tej choroby z grupy DAA. Może mieć to znaczenie przy rozważaniu potencjalnych interakcji tych leków u pacjentów z HCV, jak i stosowaniu jednocześnie innych leków podlegających metabolizowaniu przez omawiane w dysertacji izoenzymy CYP450, a podawanych w leczeniu innych chorób, np. chorób krążenia u takich pacjentów, na co ostatnio wskazują niektórzy specjaliści (Borghi et al. *J. Clin. Med.* 2022; 11(23): 6946; Canonico et al. *Front Pharmacol.* 2022; 13: 916361). Zagadnienie określenia zmian metabolizmu leków DAA jest obecnie coraz częściej podkreślane, bowiem ostatnio zauważono w badaniach modelowych, że stłuszczenie wątroby może skutkować osłabieniem reakcji konwersji sofosbuwiru do jego aktywnego metabolitu, co daje możliwe wyjaśnienie zmniejszenia skuteczności tego leku pacjentów dotkniętych wirusem HCV genotypu 3 (Gabbia et al. *Biology (Basel)*. 2022; 11(5): 693).

Tak więc potencjał podjętej tematyki recenzowanej dysertacji jest duży i niewątpliwie może znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej, o czym zresztą wspomina Autor w krótkim rozdziale pt.: „Korzyści badań”.

Konkludując, przeprowadzone badania, otrzymane wyniki i wyciągnięte na ich podstawie odpowiednie wnioski stanowią oryginalny wkład Autora w lepszym zrozumieniu skomplikowanych mechanizmów wpływających na ekspresję enzymów metabolizujących leki w chorobach zakaźnych wątroby, a zwłaszcza wywołanych przez wirusa typu C.

Mimo bardzo dobrej treści jak i formy tej pracy, nie uniknięto też pewnych, acz nielicznych, nieścisłości bądź uchybień w większości o charakterze redakcyjnym. Do nich należy błędny opis wyników przedstawionych na Rysunku 54 odnoszący się do ekspresji mRNA dla genu UGT2B15, bowiem wartości dla ekspresji mRNA dla grupy HCV wzrosły a nie zmalały o 30% w stosunku do grupy kontrolnej, jak podano w pracy (str. 81). Ponadto, na Rysunku 3 błędnie podano „związkami” zamiast „związkami”, a w spisie treści błędnie podano jako metodę „LC – MC/MS” zamiast „LC-MS/MS” oraz w rozdziale 5.2 (str. 82) niepotrzebnie dwukrotnie wymieniono CYP2C8. Cytowane piśmiennictwo winno być ujednolicone do jednego z najczęściej stosowanych standardów. Ponadto dla pozycji z

cytowanego piśmiennictwa a mianowicie: 16, 33-43, 51, 72, 84, 94, 107, 113-135, 146, 147, 170, 181 przedstawione dane bibliograficzne są niepełne i wymagają uzupełnienia (np. brak wydawcy w pozycjach książkowych, tytułu pracy, stron, tomów lub innych parametrów służących do pełnej identyfikacji danej publikacji w czasopiśmie naukowym).

Do otwartych pytań natomiast należy, czy nie należałoby uzupełnić analizy korelacyjnej zamieszczonej w dysertacji o korelacje pomiędzy ekspresją na poziomie mRNA a białkiem dla badanych genów w materiale pochodzącym z grup kontrolnych (a nie tylko od pacjentów z HCV), co pozwoliłoby lepiej określić te zależności jako mniej lub bardziej związane z marskością wywołaną przez HCV.

Przedstawione uwagi są bardzo nieliczne i mają charakter w większości charakter incydentalny, stąd nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji pracy.

Podsumowując, w mojej opinii przedstawiona do oceny praca odpowiada w pełni wymogom stawianym rozprawom doktorskim w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. określonym w art. 187 - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 poz. 85 z późn. zm.) tj. stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie Pana mgr Łukasza Skalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 10.07.2023


prof. dr hab. Przemysław Mikołajczak