

Poznań, 3 października 2023 roku

dr hab. Marzena Skrzypczak-Zielińska, prof. IGC
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

Ocena rozprawy doktorskiej

mgra Łukasza Skalskiego
pt. „Ekspresja enzymów metabolizujących leki w przebiegu HCV”

wykonanej w Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Pomorskiego
Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie
pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Mateusza Kurzawskiego

1. Tematyka podjętych badań

Temat podjętych badań jest bardzo aktualny i nowatorski, a także o dużym znaczeniu praktycznym. Do niedawna jedną z najważniejszych metod leczenia niewydolności wątroby u pacjentów z wirusowym zapaleniem wątroby typu C (HCV) był przeszczep wątroby, który stanowił istotną część dotychczas przeprowadzanych przeszczepów w Polsce. Przełomem w leczeniu przewlekłego HCV było w 2015 roku odkrycie i wprowadzenie postępowania opartego na lekach o bezpośrednim działaniu na wirusa (bez interferonu), zapewniające eliminację tego zakażenia u ponad 90% chorych. Lista leków w przebiegu HCV obecnie jest szeroka i nadal się powiększa. Dostępne terapie przewidują dużą liczbę schematów umożliwiając dobór leków do indywidualnych potrzeb pacjenta. Z drugiej strony, bardzo ważnym elementem personalizacji leczenia jest poznanie wpływu różnych czynników, w tym patologicznych, warunkujących wydajność enzymów wątrobowych odpowiedzialnych za metabolizm leków i ksenobiotyków. Zmiany w biotransformacji leków mogą mieć wiele przyczyn, ale w efekcie często prowadzą do obniżenia lub braku efektu terapeutycznego oraz wystąpienia skutków ubocznych terapii. Stwierdzam zatem, że zagadnienia podjęte w rozprawie dotyczące ekspresji enzymów metabolizujących leki w przebiegu HCV są ważnym tematem badawczym, a uzyskane wyniki są pożądane nie tylko w kontekście naukowym, ale i zastosowaniu klinicznym. Z drugiej strony nadal stosunkowo niewiele jest prac z tematyki biotransformacji w przebiegu HCV, stąd temat uważam za odkrywczy.

2. Ocena formalna

Mgr Łukasz Skalski poprawnie sformułował hipotezy badawcze, właściwie dobrał i zastosował metodykę, a treść pracy odpowiada tematowi określoneemu w tytule. Pod względem formalnym rozprawa nie budzi zastrzeżeń i napisana jest w tradycyjnym układzie, obejmując następujące rozdziały: wstęp, cel pracy, materiały i metody badawcze, korzyści badań, wyniki i omówienie wyników badań, dyskusja, wnioski końcowe, streszczenie, piśmiennictwo, spis rycin, spis tabel, a także załączniki do pracy. Na początku, pracy poza spisem treści, znajduje się wykaz skrótów. Spis cytowanego piśmiennictwa obejmuje 194 pozycje w większości z ostatnich lat, zarówno autorów polskich, jak i zagranicznych, które zostały uszeregowane wg kolejności cytowania w tekście.

Tabele wynikowe zawierające zestawienie wartości p przeprowadzonych analiz statystycznych oraz statystykę opisową dla uzyskanych poziomów ekspresji mRNA i stężeń białek w próbkach pochodzących od pacjentów z HCV stanowią Załączniki nr 1-3 przedstawionej pracy. W Załączniku nr 4 została zamieszczona pełna wersja opublikowanej w 2023 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* pracy oryginalnej (współczynnik IF: 5,6; punkty ministerialne: 140; ilość cytowań: 2), której Pan mgr Łukasz Skalski jest współautorem i która jednocześnie zawiera część wyników rozprawy.

Rozprawa napisana jest poprawną polszczyzną. Zauważalne są tylko drobne błędy językowe i edytorskie. Doktorant zamieścił w pracy liczne ilustracje i wykresy, które ułatwiają zrozumienie tekstu i są jak najbardziej pożądane w pracy. Drobna uwaga dotyczy podpisu ilustracji, gdyż są kolejno nazwane jako „rysunek”. Trafniej jest zastosować określenie „rycina” zgodnie z nazwą zestawienia „Spis rycin” (str. 133). W liczbach dziesiętnych często pojawia się kropka jako znak oddzielenia od części całkowitej, gdzie powinien być przecinek, np. Tabele 1, 8-10, w metodyce np. na str. 54. W Tabeli 3 zastosowano skrót „NA”, brakuje jego wyśnienia (str. 47-8). W Tabeli 6 i 7, w nazwie kolumny „Lokalizacja chromosomowa” brakuje adnotacji odnośnie wersji genomu referencyjnego człowieka (hg, ang. *human genome*). W miejsce sformułowania „ikosaedralna budowa kapsydu” powinno być „ikosaedralna budowa kapsydu” (str. 30). Określenie „jonizacja elektroosprężowa” należałoby być zastąpić terminem „jonizacja poprzez elektrorozpylanie” (str. 61). Wymienione w niniejszej recenzji uchybienia zostały wymienione z obowiązku recenzenta i nie wpływają w istotny sposób na ocenę pracy.

3. Ocena merytoryczna

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została napisana w języku polskim i jest zawarta na 149 stronach maszynopisu.

Doktorant wprowadza czytelnika w tematykę swojej rozprawy doktorskiej dość obszernym, obejmującym 42 strony, ale bardzo ciekawym, spójnym i bogato ilustrowanym wstępem, który zawiera informacje o funkcji wątroby i enzymów biorących udział w biotransformacji leków. Następnie znajduje się opis dotyczący wirusowych chorób wątroby, a trzeci ostatni podrozdział jest na temat farmakoterapii wirusowego zapalenia wątroby (WZW) typu C z uwzględnieniem miejsca docelowego działania, biotransformacji i dawkowania leków, a także farmakogenetyki. Drobne zastrzeżenie budzi tylko nazwa drugiego podrozdziału (1.2, str. 29, w spisie treści prawdopodobnie omyłkowo nie zamieszczony), który skoncentrowany jest na wirusowym zapaleniu wątroby typu C. Proponowałabym adekwatnie do zawartej treści podać bardziej precyzyjny tytuł, tj. „Wirusowe zapalenie wątroby typu C” w miejsce ogólnej nazwy: „Wirusowe choroby wątroby”. Ponadto tekst tego podrozdziału obejmuje dwie tematyczne części, które można rozdzielić na: 1) Epidemiologia i przebieg WZW typu C, str. 29-33; 2) Budowa i funkcjonowanie HCV, str. 33-37 rozprawy. Są to sugestie drobnych zmian mających na celu ułatwienie dotarcia do poszczególnych treści tekstu. **Jednakże cały wstęp należy uznać za bardzo wartościowy i stanowiący aktualne opracowanie dla polskojęzycznych odbiorców zarówno z zakresu medycyny jak i nauk biologicznych.**

Głównym celem badań zawartych w rozprawie była ocena ilościowa na poziomie mRNA oraz białek kodowanych przez analizowane geny, dla poszerzenia wiedzy na temat metabolizmu leków w przebiegu patologicznego stanu wątroby jakim jest WZW typu C. Ponadto celem pracy była również ocena zależności pomiędzy wybranymi wariantami genetycznymi, a ekspresją genów związanych z metabolizmem leków na poziomie mRNA i białka w biopatach wątroby pobranych od pacjentów z niewydolnością wątroby w przebiegu HCV oraz w grupie kontrolnej. **Cel pracy uznaję za jasno sformułowany, ambitny i aktualny.**

Zastosowane Materiały i metody badawcze zostały przedstawione na 12 stronach rozprawy. Materiał do badań stanowiły tkanki wątroby pobrane od 58 pacjentów z HCV w różnych stanach funkcjonalnych wątroby, zgodnie z klasyfikacją Childa-Pugha oraz tkanki wątroby nieposiadające cech patologicznych od 20 osób, jako grupa kontrolna. Materiał ten został uzyskany przy współpracy z Oddziałem Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej, Samodzielnego Publicznego Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Szczecinie. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie. Oznaczenia molekularne obejmowały ekspresję mRNA z użyciem metody ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) dla genów kodujących dziewięć enzymów z rodziny cytochromu P450 (CYP1A2, CYP2B6,

CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5) i czterech glukuronylotransferaz (UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7 i UGT2B15). Oznaczano także zawartość białka powyższych 13 enzymów w badanych wycinkach tkankowych z użyciem chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Ponadto, prowadzono analizy na poziomie DNA z użyciem sond typu TaqMan[®], które miały na celu określenie genotypów i zmian liczby kopii genu mogących prowadzić do zmiany aktywności kodowanego enzymu, a także ilości powstającego RNA i białka. Biorąc pod uwagę, że biopsaty wątroby są trudno dostępnym materiałem, a także badania dotyczyły prób od pacjentów, którzy nie posiadali chorób współistniejących (wymagające kryterium), w moim przekonaniu **liczebność grupy badanej jest wystarczająca. Do metodyki także nie mam żadnych zastrzeżeń.**

Rozdział Wyniki liczy 32 strony. Został podzielony na trzy podrozdziały, mianowicie: 1) Ilościowe określenie zawartości RNA i białek wybranych enzymów CYP450 i UGT, 2) Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA badanych genów a zawartością białka, 3) Analiza związku pomiędzy wybranymi wariantami genetycznymi, a ekspresją genów związanych z metabolizmem leków oceniona na poziomie mRNA i białka. Uzyskane wyniki są bardzo obszerne. Pozwolę sobie na przedstawienie tylko najważniejszych. Autor rozprawy wykazał, że zakażenie HCV nie miało istotnego wpływu na zawartość białka kilku konkretnych enzymów, tj. w CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 i CYP3A5, ale próbki wątroby pobrane od pacjentów z różnych stanów funkcjonalnych narządu charakteryzowały specyficznie zmienione zawartości białka. Mianowicie istotnie wyższe stężenie UGT1A1 występowało w próbkach pacjentów z niewydolnością wątroby klasy A wg skali Childa-Pugha w porównaniu do kontroli, obniżone stężenia CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4, UGT1A3 i UGT2B7 miało miejsce w próbkach klasy B niewydolności wątroby w stosunku do kontroli, a próbki wątroby pacjentów z niewydolnością wątroby klasy C cechował obniżony poziom białka CYP1A2. Wyniki te uważam za bardzo ważne, gdyż można stwierdzić, że stężenie białek odzwierciedla zarówno występowanie patologii wątroby jak i stan funkcjonalny tego narządu. Ta część danych, przedstawiona graficznie w postaci diagramów kołowych (Rycina 36 i 37, str. 66), mogłoby zostać zastąpiona wykresem słupkowym, który zestawiałby wyniki na jednej rycinie dla grupy badanej i kontrolnej stwarzając możliwość łatwiejszego porównania danych. Podobnie w przypadku diagramów na rycinach 38-40, dotyczących zawartości białek wybranych enzymów metabolizujących leki w przebiegu HCV u pacjentów z różnym stopniem niewydolności wątroby (A, B i C). Doktorant wykazał także, że stężenia badanych białek u pacjentów z HCV korelują z ekspresją mRNA kodujących je genów, jednakże korelacja ta nie była pełna i różniła się

w zależności od badanego enzymu. Zgodnie z tym co doktorant podniósł w dyskusji, dane proteomiczne stanowią bardziej precyzyjne narzędzie do badania aktywności enzymatycznej i stanu wydolności wątroby aniżeli wyniki ekspresji mRNA. Trzecia część uzyskanych wyników pozwoliła wskazać na jednoczesną rolę wariantów DNA na zawartość mRNA i białka enzymów CYP2D6, CYP3A5 i CYP2C19 w badanych próbkach wątrobowych pacjentów z HCV. **Poczynione obserwacje są bardzo cenne** i wynika z nich, że zarówno zamiany powstałe na skutek zaburzeń funkcji wątroby w przebiegu infekcji HCV, jak i warianty genetyczne mogą być przyczyną zmienionej aktywności wybranych enzymów z rodziny CYP450 i UGT, a w konsekwencji zmienionej farmakokinetyki leków. Uzyskane wyniki znacząco poszerzają wiedzę w zakresie procesów biotransformacji toczących się w wątrobie podczas WZW typu C i różnego stopnia niewydolności tego narządu.

Rozdział Dyskusja składa się z 12 stron. Doktorant ciekawie omawia uzyskane wyniki, zestawiając je z danymi z aktualnego piśmiennictwa oraz dodając praktyczne komentarze, z którymi się zgadzam. Niniejsza rozprawa stanowi kontynuację badań prowadzonych od wielu lat w zespole promotora - Pana profesora dr hab. Matusza Kurzawskiego. Doktorant odnosi się do tych prac, potwierdzając wcześniejsze obserwacje, ale też zauważa nowe zależności jak podwyższone stężenia białka UGT1A1 w próbkach pacjentów z HCV, które mogły wynikać z powiększenia liczby analizowanych przypadków.

Najważniejsze informacje z badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały zebrane w postaci pięciu wniosków. Uzyskane wyniki pozwoliły na realizację założonego celu. Wykazano, że stężenia mRNA i białek dla większości enzymów metabolizujących leki u pacjentów z niewydolnością wątroby w przebiegu HCV były obniżone w porównaniu do wątroby pacjentów z grupy kontrolnej, przy czym zawartość białka UGT1A1 była podwyższona, szczególnie u pacjentów w klasie A niewydolności wątroby wg skali Childa-Pugha. Ponadto, obserwowane zmiany stężenia białek enzymów metabolizujących leki były zależne od stopnia niewydolności narządu, co jest bardzo ważnym wnioskiem z uwagi na jego aspekt praktyczny i potrzebę uwzględniania klasyfikacji Childa-Pugha w podejmowaniu decyzji klinicznych w pacjentów z WZW typu C. Następnie stężenia badanych białek u pacjentów z HCV wykazywały korelację, ale nie pełną i zróżnicowaną z ekspresją kodujących je genów mierzoną na poziomie mRNA. Wykazano także, że czynniki genetyczne mogą mieć wpływ na zawartość mRNA i białka enzymów CYP2D6, CYP3A5 i CYP2C19, a 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. Wiedza ta może być użyteczna w opracowaniu bardziej skutecznych i bezpiecznych strategii

terapeutycznych, dostosowanych do indywidualnych potrzeb pacjentów. **Nie mam zastrzeżeń co do formy przedstawienia wniosków.**

Podsumowując, uważam, że Pan mgr Łukasz Skalski przygotował ciekawą, i wartościową rozprawę doktorską, po przeczytaniu której nasuwają się pytania: 1) Jakie są możliwości kontynuacji prowadzonych badań? Czy jest przestrzeń na połączenie uzyskanych wyników w niniejszej rozprawie np. z badaniami obrazowymi wątroby i stworzenie algorytmu postępowania diagnostycznego z wykorzystaniem metod sztucznej inteligencji i uczenia maszynowego? Jaka jest opinia doktoranta? 2) Według zaleceń *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* z 2015 r. w miejsce terminów „mutacja” i „polimorfizm”, i w celu nazwania jakichkolwiek odstępstw od wzorcowej sekwencji DNA powinno się stosować określenie „wariant” z odpowiednim przymiotnikiem, tj. „wariant patogenny”, „prawdopodobnie patogenny”, „łagodny”, „prawdopodobnie łagodny” lub „wariant o nieznanym znaczeniu klinicznymi”. Doktorant używa w pracy zamiennie terminów „wariant”, „mutacja”, „zmiana”, lub „wariant”, „polimorfizm”, „allel”. Nie wskazywałam tego jako błąd, gdyż farmakogenetyka wydaje się posiadać własne prawa. Jaką nomenklaturą powinniśmy się posługiwać w przypadku wariantów genów kodujących enzymy wątrobowe, gdzie znane jest nazewnictwo bazujące na allelach i ważna jest informacja o ich wpływie na tempo metabolizmu? Jakie jest zdanie doktoranta w tym zakresie?

4. Wniosek końcowy

Doktorant porusza w rozprawie bardzo aktualny i ważny temat. Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską stwierdzam, że Pan mgr Łukasz Skalski przygotował wartościową pracę, zgodną z Ustawą 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.) oraz Ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. - Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669, z późn. zm.). Powyższe wnioski upoważniają mnie do zwrócenia się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie Pana mgra Łukasza Skalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Marzena Skrzypczak-Zielińska