

Recenzja
w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego
pani dr n. med. Małgorzacie Sidorkiewicz
starszemu wykładowcy w Zakładzie Biochemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Podstawą wszczęcia postępowania habilitacyjnego w dziedzinie nauk medycznych dyscyplinie biologia medyczna jest osiągnięcie naukowe pani dr Małgorzaty Sidorkiewicz "Nowe czynniki związane z przetrwaniem wirusa zapalenia wątroby typu C w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej", udokumentowane cyklem 5 publikacji jakie ukazały się w latach 2009 - 2013. Załączone publikacje spełniają warunki merytoryczne i formalne (istotność naukowa i nowatorstwo osiągnięć, impakty czasopism, wkład wnioskodawczyni w powstanie publikacji, jej pozycja w wykazach autorów, tematyka publikowanych badań) wymagane dla wszczęcia postępowania habilitacyjnego.

Problemem badanym przez dr Sidorkiewicz było zjawisko przetrwania zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) uwarunkowane pozawątrobową replikacją HCV w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC). Mechanizm ten w znacznej mierze odpowiedzialny jest za przejście wirusowego zapalenia wątroby typu C w postać przewlekłą, w 20-60% oporną na skojarzone leczenie pegylowanym interferonem alfa (PegIFN α) z ryboflawiną (RBV). Zdaniem autorki znalezienie metody radykalnej eliminacji HCV z populacji PBMC powinno znacząco poprawić skuteczność leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C, zwiększając odsetek trwałych wyleczeń. W konsekwencji, autorka wykonała szereg badań poświęconych poszukiwaniu i analizie czynników towarzyszących przetrwaniu HCV RNA w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej.

Wyjściem dla badań, których wyniki przedstawiono w cyklu publikacji składających się na podstawę wniosku habilitacyjnego były wcześniejsze obserwacje uzyskane przez dr Sidorkiewicz, dokumentujące zjawisko przetrwania genomu HCV w PBMC pacjentów, u których w efekcie leczenia obserwowano eliminację HCV RNA z surowicy. Autorka założyła, że jednym z kluczowych mechanizmów może być zależność cyklu życiowego HCV od metabolizmu lipidowego gospodarza. Przemawiał za tym udział receptora dla lipoprotein o niskiej gęstości (LDL-R) i receptora scavenger (SR-B1) w procesie wnikania wirusa do

komórki oraz rola traw lipidowych w procesie replikacji wirusa. Również na etapie opuszczania komórki przez zakaźne cząstki wirusa niezbędny jest udział bogatych w cholesterol lipoprotein, tworzących z wirusem tzw. cząstki wiro-lipidowe (Viro-Lipo-Particles, VLP). Jednym z cząstkowych celów pracy było sprawdzenie, czy podobieństwo pomiędzy metabolizmem lipidów w wątrobie i PBMC znajduje odzwierciedlenie w korelacji zmian metabolizmu szlaku mewalonowego z przetrwaniem HCV RNA w PBMC i efektami zastosowanej terapii.

Pierwsza z cyklu publikacji (*Virus Research 145:141-144, 2009*) dokumentuje badania zależności pomiędzy zmianami metabolizmu cholesterolu a stopniem eliminacji HCV RNA u chorych leczonych PegIFN α + PBV. Autorka udowodniła korelację pomiędzy niskim poziomem LDL-cholesterolu a brakiem eliminacji HCV RNA zarówno z surowicy jak i w PBMC. Średni poziom cholesterolu występował u chorych u których HCV RNA wykrywalny był jedynie w PBMC, przy jego eliminacji z surowicy krwi. Chorzy, u których leczenie skutkowało eliminacją HCV RNA zarówno z krwi, jak i z PBMC cechowali się najwyższymi poziomami cholesterolu. Wysoki poziom cholesterolu korelował również z osiągnięciem trwałej odpowiedzi wirusologicznej (SVR). Jednym z odpowiedzialnych za opisane zjawiska mechanizmów jest sugerowana przez autorkę konkurencja LDL i VLP w odniesieniu do receptora LDL, skutkująca zahamowaniem wiązania HCV a tym samym ograniczeniem propagacji HCV. Analizując ekspresję reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMG-CoA), będącej wskaźnikiem aktywności szlaku mewalonowego, autorka wykryła, że zwiększenie jej aktywności w PBMC nie wiązało się z podwyższeniem poziomu wewnątrzkomórkowego cholesterolu, korelowało natomiast z podwyższoną ekspresją syntazy pirofosforanu geranylgeranylu, zmieniając równowagę pomiędzy syntezą wymienionego związku a syntezą cholesterolu. Pobudzenie syntezy pirofosforanu geranylgeranylu może stymulować replikację HCV zmniejszając prawdopodobieństwo jego eliminacji.

Kolejnym etapem badań (publikacja w *Acta Virologica 54:71-74, 2010*) było uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy w PBMC ma miejsce ekspresja podjednostek α i β 3 receptora GABA A a jeżeli tak, to czy ma związek z przewlekłym zakażeniem HCV. Autorka wykazała, że w porównaniu ze zdrowymi osobnikami grupy kontrolnej, u chorych na przewlekłe zapalenie wątroby typu C obserwowana jest wyższa ekspresja podjednostki α 1 i obniżona ekspresja podjednostki β 3. Sugerowanym skutkiem tych zmian może być stymulacja proliferacji PBMC zawierających HCV RNA, skutkująca rozszerzaniem infekcji.

Trzecia z cyklu publikacja (*International Journal of Molecular Medicine* 28:875-880, 2011) dokumentuje badania autorki dotyczące ekspresji mikro RNA. Badania, mające cechy nowatorstwa, dotyczyły ekspresji miR-196b i miR-155 w PBMC i jej potencjalnego wpływu na przetrwanie HCV RNA w tych komórkach. Wstępnym etapem było badanie obecności prekursora miR-155 (pri-miR-155/BIC) w komórkach pacjentów z przewlekłą infekcją HCV będących w trakcie leczenia. Autorka stwierdziła, że poziom detekcji pri-miR-155 koreluje z obecnością HCV RNA: u chorych z wykrywalnym HCV RNA w surowicy i PBMC poziom ten był najwyższy, znamienne niższy u chorych u których w surowicy nie wykrywano HCV RNA, a najniższy w przypadku nieobecności HCV RNA zarówno w PBMC, jak również w surowicy krwi. Te nowatorskie wyniki były przesłanką do podjęcia przez autorkę badań nad ekspresją dojrzałego miR-155 i miRNA-196 u leczonych chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. Wyniki tych badań stanowią treść następnej publikacji z cyklu (*European Journal of Microbiology and Infectious Diseases* 31:537-542, 2012). Zarówno u zdrowych osób, jak u pacjentów leczonych z powodu przewlekłego zapalenia wątroby typu C wykrywalna była ekspresja miR-155 i miR-196b, przy czym obie wykazywały silną dodatnią korelację. Dla wykrywania replikacji HCV RNA w PBMC zastosowano test detekcji nici antygenomowej wirusa. Dodatni wynik tego testu korelował z wysoką ekspresją miR-155 i miR-196b, jak również z obecnością prekursora miR-155 (BIC) i białka Dicer, które uczestniczy w procesie dojrzewania mikro RNA. Nieobecność cech replikacji HCV, wykrywana jako nieobecność nici antygenomowej w PBMC skojarzona była ze znamienne niższymi poziomami ekspresji miRNA-155 i miR-196b. Wnioskiem z badań wykonanych przez autorkę jest istnienie związku pomiędzy replikacją HCV w PBMC a podwyższeniem poziomu ekspresji miRNA-155 i miR-196b które interpretowane jest jako efekt oddziaływania wirusa na komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, którego z kolei skutkiem jest przetrwanie HCV w organizmie leczonego.

Kolejnym tematem badawczym podjętym przez autorkę i kontynuowanym do chwili obecnej (publikacja w *Virus Research* 178:539-542, 2013) jest wyjaśnienie związku pomiędzy ekspresją miR-122 w PBMC i w wątrobie a replikacją HCV RNA skutkującą opornością przewlekłego zapalenia wątroby typu C na stosowane leczenie. Tematyka badań stanowi nawiązanie do wcześniejszych badań autorki dotyczących powiązań pomiędzy przetrwaniem zakażenia HCV a przemianami lipidowymi (*Virus Research* 145:141-144, 2009) w wyniku których wykazała ona ścisłą zależność pomiędzy przetrwaniem HCV RNA w surowicy krwi i PBMC i poziomem cholesterolu w surowicy chorych leczonych Peg-IFN α -RBV.

Tematem badań była rola mikroregulatora przemian lipidowych w wątrobie, jakim jest cząsteczka mikroRNA-122, w replikacji HCV. Autorka wykazała jako pierwsza, że niezależnie od hipercholesterolemii osoczowej u chorych na przewlekłe zapalenie wątroby typu C, poziom cholesterolu wewnątrzkomórkowego w PBMC jest u nich znamienne obniżony w porównaniu ze zdrowymi osobnikami grupy kontrolnej. Inną istotną, nowatorską obserwacją było zjawisko braku wpływu poziomu ekspresji miR-122 na poziom wewnątrzkomórkowy cholesterolu w PBMC chorych, oraz brak związku pomiędzy ekspresją miR-122 a aktywnością replikacji HCV RNA. Wyniki te, uzyskane w modelu in vivo, są odmienne od danych z obserwacji in vitro publikowanych przez innych autorów i sugerują, że mechanizm wpływu miR-122 na replikację HCV RNA jest odmienny i bardziej skomplikowany niż zakładany do tej pory. Zbliżonym, badanym obecnie przez autorkę zagadnieniem, jest różnica oddziaływania na syntezę HCV RNA przez miR-122 w komórkach wątroby i w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej.

Podsumowując osiągnięcia badawcze autorki można stwierdzić, że wnoszą one istotne nowe informacje do problematyki interakcji wirus-gospodarz w opornych na leczenie przypadkach wirusowego zapalenia wątroby typu C i mogą się przyczynić do poprawy skuteczności trwałych wyleczeń poprzez znalezienie sposobu eliminacji wirusa z puli jednojądrzastych komórek krwi obwodowej.

Tematyka badawcza rozwijana przez panią dr Małgorzatę Sidorkiewicz podczas jej pracy w Akademii Medycznej (Uniwersytecie Medycznym) w Łodzi poświęcona była prawie bez wyjątku badaniu różnych aspektów związanych z wirusowym zapaleniem wątroby. Wyspecjalizowanie się w stosunkowo wąskiej tematyce badawczej przyniosło pozytywne rezultaty - dr Sidorkiewicz jest ekspertem w swojej dziedzinie badań posiadającym istotny dorobek badawczy dotyczący różnorodnych interakcji pomiędzy wirusami zapalenia wątroby, komórkami docelowymi chorego i stosowanymi metodami leczenia.

Inne jej badania, prowadzone od roku 1987, dotyczyły między innymi problematyki:

- konstrukcji wektorów plazmidowych dla ekspresji białek antygenowych HPV, HIV i HBV (nagroda Sekretarza PAN);
- skonstruowania wektora ekspresyjnego kodującego 4 powtórzenia białka preS1 (20-49aa) oraz uzyskania rekombinowanego białka preS1 (praca doktorska, publ. 1991, 2 patenty);
- antygenowych właściwości białek preS1 w różnych postaciach wirusowego zapalenia wątroby typu B;

- jakościowej i ilościowej analizy obecności genomu wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV DNA), opracowania metod molekularnych wykrywania wirusa niezależnie od statusu antygenowego pacjenta;
- wpływu IL-6 na przebieg infekcji HBV in vitro w hodowlach PBMC;
- roli białka X wirusa zapalenia wątroby typu B (HBx) w regulacji cyklu komórkowego i zdolności regeneracyjnych wątroby (INSERM, Paris);
- optymalizacji metod oznaczania HCV RNA dla monitorowania procesu leczenia;
- określenia własności antygenowych białka rdzeniowego wirusa zapalenia wątroby typu C (Unite Epidemiologie Moleculaire des Enterovirus, Pasteur Institute, Paris);
- badania mechanizmów działania angiotensyny w raku prostaty;
- antygenowej charakterystyki (VP7, VP4) serotypów ludzkiego rotawirusa;
- związku polimorfizmu w obszarze promotora genu IL-28 z efektami terapii antywirusowej.

Wnioskodawczyni kierowała 2 tematami badawczymi KBN/NCN i 4 tematami własnymi AM/UMED.

Dorobek naukowy wnioskodawczyni w momencie składania wniosku to:

Sumaryczny Impact Factor: 23,932

Punkty MNiSW: 276

Liczba cytowań (Scopus): 192

Indeks Hirscha: 5

W podsumowaniu oceniam, że załączony cykl publikacji dokumentujących osiągnięcia naukowe dr Małgorzaty Sidorkiewicz "Nowe czynniki związane z przetrwaniem wirusa zapalenia wątroby typu C w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej. Cykl 5 publikacji" spełnia wymóg art. 16 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r., Dz. U. nr 65, poz. 595, oraz że wykaz osiągnięć, publikacji i innych dokumentów stanowiących o jej dorobku naukowym spełnia merytoryczne i formalne warunki wymagane dla nadania jej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna. Wniosek pani dr Małgorzaty Sidorkiewicz o nadanie jej stopnia doktora habilitowanego popieram.

Warszawa, 31 października 2014 r.

prof. dr hab. med. Zygmunt Pojda