

Dr hab. n. med. Piotr Wilczek prof. IPS

Fundacja Rozwoju Kardiologii im. Prof. Zbigniewa Religi

W Zabrze

RECENZJA

Rozprawa doktorska na stopień doktora nauk medycznych

mgr Emilia Morawiec

pt.: „Profil ekspresji genów kodujących czynniki restrykcyjne w komórkach zakażonych retrowirusami PERV”

Przedstawiona mi do recenzji praca porusza niezwykle istotny problem zarówno badawczy jak i praktyczny dotyczący możliwości wykorzystania świń jako dawców komórek, tkanek i narządów zwłaszcza w zastosowaniach związanych ksenotransplantacją oraz bioinżynierią innowacyjnych bioprotez. Świnie ze względu na duże podobieństwo anatomiczne oraz fizjologiczne wydają się być optymalnym modelem do tego rodzaju zastosowań. Pomimo że od wielu lat z dużym powodzeniem stosowane są metody hodowli zwierzęcych dawców wolnych od patogenów w dalszym ciągu istotnym problemem pozostają endogenne retrowirusy świń tzw. PERV które stanowią integralną część genomu świń, a które są trudne do eliminacji ze względu na wiele miejsc kodowania w organizmie gospodarza. Istotnym problemem pozostaje fakt ich uaktywnienia oraz ujawnienia właściwości patogennych w organizmie biorcy. W chwili obecnej wdrażane są różnorodne techniki których celem jest usunięcie lub wyciszenie sekwencji kodujących PERV w genomie świń. Do najczęściej stosowanych należą syntetyczna nukleaza o modelu palca cynkowego ZNF (ang. Zinc Finger Nucleases), aktywator transkrypcji TALEN (ang. Transcription Activator -Like Effector Nucleases) czy technika krótkich, palindromowych powtórzeń związanych z białkiem 9 CRISPR-Cas9 (ang. Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats/ CRISPR-associated protein 9). Jednak wciąż otwartym pytaniem pozostaje jaki wpływ mają wymienione techniki na organizm zarówno dawcy jak i biorcy. Wirusy PERV możemy podzielić na trzy podtypy: PERV-A, PERV-B oraz PERV-C. Szczególną infekcyjność wobec ludzkich komórek wykazuje PERV-C zwłaszcza w przypadku rekombinacji z podtypem PERV-A. Z tego względu z ksenotransplantacji wyłącza się te zwierzęta, u których stwierdzoną dużą ekspresję PERV-C. Należy również podkreślić, że pomimo że przeszczepy stały się powszechnie akceptowaną metodą leczenia w przypadku skrajnej niewydolności narządowej w dalszym ciągu istotnym problemem pozostaje duża dysproporcja pomiędzy ilością dawców i biorców. Z tego względu ksenoprzeszczepy wydają się być optymalnym rozwiązaniem w kontekście alternatywnych źródeł przeszczepiania komórek i tkanek lub jako pomost do przeszczepów od dawców ludzkich. Istotne jest jednak, aby zapewnić bezpieczeństwo stosowanych procedur medycznych, dlatego też tak kluczowe jest poznanie wszystkich mechanizmów potencjalnej

aktywacji i patogennego działania retrowirusów PERV na komórki ludzkie. Stanowi to niewątpliwe osiągnięcie autorki.

Przedstawiona mi do oceny monografia liczy łącznie 61 stron. Ponadto integralną częścią pracy są dołączone publikacje będące podstawą dysertacji. Tworzą ją następujące części: wprowadzenie, cel pracy, materiały, wyniki, dyskusja oraz wnioski. Kończącą część rozprawy stanowi bibliografia obejmująca aż 96 pozycji literaturowych, właściwie i w sposób wyczerpujący dobranych i cytowanych. W monografii zamieszczono również wykaz najważniejszych skrótów, wykaz publikacji na podstawie których przygotowana została dysertacja, wykaz tabel oraz rysunków. W końcowej części umieszczono również streszczenie w języku polskim i angielskim. Układ pracy jest przejrzysty i czytelny, a proporcje poszczególnych rozdziałów zostały zachowane. Poszczególne rozdziały są podzielone w logiczny sposób na podrozdziały wyodrębniające się ze względu na problem szczegółowy lub metodykę badań. Pozwala to śledzić przyjęty przez autorkę kierunek prowadzonych prac.

Pracę rozpoczyna obszerne wprowadzenie, w którym autorka w poszczególnych podrozdziałach w sposób wyczerpujący przedstawia, problematykę endogennych retrowirusów koncentrując się na wirusach PERV, ze względu na ich szczególne znaczenie w ksenotransplantacji. Dużą zaletą tego rozdziału są zamieszczone ryciny, które pomagają w lepszym zrozumieniu opisywanych zagadnień. Obszerne wprowadzenie, w którym autorka opisuje zagadnienia dotyczące budowy PERV oraz ich cyklu replikacyjnego, czynniki restrykcyjne, wnikanie wirusa do komórki, blokowanie odpłaszczania czy też odwrotnej transkrypcji jest bardzo pomocne dla pełnego zrozumienia poruszanej problematyki. Niewątpliwie wskazuje również na bardzo dobrą znajomość poruszanych zagadnień jaką wykazuje Pani mgr Emilia Morawiec.

W kolejnym rozdziale „Cel pracy” autorka formułuje cztery główne cele pracy czyniąc to w sposób przejrzysty i czytelny. Formułując cele pracy, Pani mgr Emilia Morawiec oparła je o prawidłowo przyjęte założenia. Wskazuje, że pierwszym celem pracy jest opracowanie układu modelowego umożliwiającego analizę infekcyjności PERV wobec ludzkich komórek NHDF. Takie podejście jest właściwe i uzasadnione, ponieważ stworzenie właściwego układu modelowego jest czynnikiem determinującym uzyskanie pozostałych celów pracy oraz jej podstawowego założenia związanego z określeniem profilu ekspresji genów kodujących czynniki restrykcyjne w komórkach zakażonych retrowirusami PERV. W dalszej kolejności autorka stawia sobie za cel: opracowanie algorytmu dedykowanego do selekcji sond na mikromacierzy, typowanie genów różnicujących komórki NHDF zaangażowanych w blokowanie poszczególnych etapów cyklu replikacyjnego PERV i wreszcie analizę profilu mikromacierzy miRNA, które mogłyby stanowić czynniki epigenetyczne związane z regulacją ekspresji wytypowanych genów mRNA różnicujących komórki NHDF. Takie podejście stanowi o innowacyjności prowadzonych badań, istotnie poszerza wiedzę w zakresie profilu ekspresji genów kodujących czynniki restrykcyjne w komórkach zakażonych endogennymi

retrowirusami, sposób realizacji tych celów wskazuje również, że praca posiada istotny potencjał do tego, aby znaleźć zastosowanie praktyczne.

Kolejny rozdział „Materiały” w sposób przejrzysty objaśnia szczegóły metodyczne pracy. Autorka Pani mgr Emilia Morawiec przedstawia w sposób czytelny założenia przyjęte do tworzenia układu modelowego stopnia infekcyjności, prowadzenia hodowli wybranych linii komórkowych w układzie monokultury oraz kokultury z komórkami świńskimi wykorzystywanymi jako donor wirusów PERV, oraz szczegóły badań molekularnych w tym wyznaczenie profilu mRNA metodą mikromacierzy HG-U133A2.0 Affymetrix, wyznaczenie profilu miRNA metodą mikromacierzy 2.0Affymetrix, system selekcji sond do analizy mirkomacierzy. Czytelność całego rozdziału zwiększa zamieszczona rycina przedstawiająca schemat eksperymentu oraz zawarte w rozdziale tabele prezentujące sekwencje starterów stosowanych w eksperymencie. Należy podkreślić, że taka konstrukcja eksperymentu świadczy o dobrej znajomości warsztatu metodologicznego, co stanowi jednocześnie gwarancję uzyskania poprawnych wyników, a co za tym idzie daje możliwość właściwego wnioskowania. W przedstawionej mi do recenzji monografii Pani mgr Emilii Morawiec, zaprezentowano szeroki i w pełni satysfakcjonujący warsztat metodyczny. Wszystkie metody badawcze zostały właściwie dobrane, gwarantując rzetelność uzyskanych wyników.

Wyniki badań zostały omówione przez autorkę w sposób zwięzły i wyczerpujący, a umieszczone w tekście tabele i ryciny są pomocne w analizie danych. Warto zaznaczyć, że zastosowany podział powoduje, że omówienie wyników jest przejrzyste i zachowuje logiczny ciąg myślowy.

Kolejną część pracy stanowi rozdział „Dyskusja” w której autorka słusznie zwraca uwagę, że w aktualnej sytuacji epidemicznej infekcje wirusowe stanowią istotny problem medyczny, który wynika z możliwości ich rekombinacji, implikując pojawienie się nowych wariantów, o nieznanej zakaźności. Z tego względu odpowiednio zaprojektowana i wdrożona diagnostyka molekularna jest strategicznym narzędziem do walki z infekcjami wirusowymi. Istotne z tego punktu widzenia jest również poznanie mechanizmów obronnych uruchamianych przez komórki ludzkie w odpowiedzi na zakażenie. Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na bardzo dobrą znajomość autorki aktualnych zagadnień związanych z infekcyjnością endogennymi wirusami zwłaszcza PERV, świadczy również o dojrzałości naukowej Pani mgr Emilii Morawiec.

Pani mgr Emilia Morawiec w części końcowej przedstawia sześć wniosków, które są dobrze udokumentowane rezultatami badań. Wnioski jakie prezentuje autorka w swojej monografii są adekwatne do założonych celów pracy jak również są spójne z otrzymanymi wynikami.

Na podkreślenia zasługuje bardzo szerokie piśmiennictwo prezentowane w rozprawie. Dobór piśmiennictwa jest prawidłowy i obejmuje najnowsze pozycje literaturowe dotyczące omawianego obszaru badań.

Uwagi:

1. W części metodycznej do przeprowadzenia badań wykorzystano prawidłowe komórki nabłonkowe nerki świńskiej PK15, komórki te były donorem wirusów PERV-A i PERV-B, warto by było uzasadnić z czego wynikał wybór tej właśnie linii jako donora wirusów, czy możliwe jest zastosowanie innych linii jako donorów wirusów.
2. Infekcyjność oceniano z wykorzystaniem komórek ludzkich linii NHDF, wydaje się, że cennym byłoby uzasadnienie wyboru tej linii komórkowej.
3. Kokulturę komórek PK15 oraz NHDF prowadzono przez okres 5 dni, wydaje się, że cennym byłoby zamieszczenie informacji czy wybór takiego czasu hodowli wynikał z analizy danych literaturowych czy był podyktowany analizą danych empirycznych.
4. Komórki linii NHDF stymulowano w hodowli lipopolisacharydem bakteryjnym LPS, cennym byłoby umieszczenie informacji z czego wynikał wybór czynnika stymulującego.

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że przedstawioną mi do recenzji monografię oceniam bardzo wysoko. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i może znaleźć również zastosowanie praktyczne. Przedstawione z obowiązku recenzenta drobne uwagi mają bardziej charakter sugestii i w niczym nie umniejszają wysokiej wartości recenzowanej rozprawy na stopień doktora nauk medycznych. Dlatego z pełnym przekonaniem uznaję, że rozprawa doktorska mgr. Emilii Morawiec pt.: „Profil ekspresji genów kodujących czynniki restrykcyjne w komórkach zakażonych retrowirusami PERV” spełnia wszelkie wymogi rozprawy na stopień doktora nauk medycznych zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Zwracam się, wobec tego do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenia Pani mgr. Emilii Morawiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Zwracam się ponadto do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Emilii Morawiec ze względu na jej istotny walor poznawczy oraz praktyczny.

02.06.2021

