

Dr hab. n. med. Piotr Wilczek

Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii im. Prof. Zbigniewa Religi

W Zabrze

## RECENZJA

Rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

mgr Krzysztof Łopata

pt.: „ Profil ekspresji genów uczestniczących w naturalnej obronie komórek NHDF przed zakażeniem endogennymi wirusami świni”

Przedstawiona mi do recenzji praca porusza niezwykle istotny problem zarówno badawczy jak i praktyczny dotyczący obrony na poziomie komórkowym przed zakażeniem endogennymi retrowirusami świni. Tkanki i komórki pozyskiwane od zwierząt stanowią atrakcyjne źródło materiału mogącego znaleźć zastosowanie w różnorodnych obszarach medycyny regeneracyjnej i personalizowanej, związanych z inżynierią tkankową, terapiami komórkowymi czy bioprotezowaniem. Szczególnie ciekawym źródłem ksenogenego materiału tkankowego są świni. Wynika to z ich podobnej do człowieka fizjologii, zbliżonych rozmiarów poszczególnych narządów, łatwości hodowli, a co za tym idzie dużej dostępności komórek, tkanek i narządów przeznaczonych do ksenotransplantacji. Należy jednak pamiętać, że istnieje szereg ograniczeń związanych z wykorzystaniem materiału ksenogenego, w tym tkanek świńskich. Jednym z nich jest ryzyko transferu odzwierzęcych retrowirusów PERV. Pan mgr Krzysztof Łopata przeprowadził badania mające na celu „ poznanie profilu ekspresji genów uczestniczących w obronie przed zakażeniem endogennymi wirusami świni”. Poznanie tych mechanizmów Doktorant oparł na analizie infekcyjności ludzkich fibroblastów. Dlatego też przedstawiona do recenzji praca doskonale wpisuje się w prowadzone na całym świecie badania, gdzie w warunkach *in vitro* rozpoznaje się mechanizmy infekowania komórek ludzkich przez PERV i ich efekty komórkowe, a przede wszystkim, podejmuje się próby opisanie mechanizmów naturalnej obrony przed zakażeniem endogennymi retrowirusami.

Przedstawiona mi do oceny praca posiada układ typowy dla rozpraw na stopień doktora. Praca liczy łącznie 129 stron. Tworzą ją następujące części: Wstęp, który wprowadza czytelnika w problemy będące tematem dociekań naukowych, z najważniejszymi odkryciami i ustaleniami, w tym zagadnieniu; Założenia i cele pracy, które mają być rozwiązane, dalej następuje opis materiału i stosowanych metod oraz opis uzyskanych Wyników, Dyskusja i Wnioski. Końcową część rozprawy stanowi spis piśmiennictwa obejmujący 205 pozycji. bardzo dobrze dobranych i cytowanych. W dokumentacji pracy zamieszczone zostały także wykazy: skrótów, tabel, rycin, aneks oraz 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 autora kierunek prowadzonych prac.

Pracę rozpoczyna bardzo obszerny wstęp podzielony na 3 podrozdziały w obrębie, których można wyodrębnić kilka sekcji. Autor w sposób przejrzysty omawia biologię retrowirusów ze szczególnym wyodrębnieniem retrowirusów PERV. Doktorant opisuje zarówno ich cykl życiowy jak i budowę, zwracając również uwagę na czynniki restrykcyjne, tak ważne dla hamowania lub ograniczania replikacji retrowirusów, które stanowią pierwszą linię obrony komórek. Wreszcie we wstępie autor omawia współczesne metody detekcji PERV w ksenotransplantacjach, wskazując na możliwość zastosowania zarówno oceny jakościowej jak i ilościowej w identyfikacji retrowirusów, w tym metod biologii molekularnej czy też alternatywnych metod immunochemicznych. Dużą zaletą tego rozdziału są liczne ryciny przygotowane w sposób bardzo staranny, które pomagają w lepszym zrozumieniu opisywanych zagadnień. Obszerny wstęp niewątpliwie wskazuje na bardzo dobrą znajomość Doktoranta poruszanych zagadnień.

Cele pracy zostały prawidłowo i czytelnie sformułowane. Formułując cele pracy, Doktorant oparł je o prawidłowo przyjęte założenia. Wskazuje, że charakterystyczną cechą retrowirusów jest wbudowanie własnego materiału genetycznego do komórki infekowanej. Jest to szczególnie niebezpieczne w przypadku ksenotransplantacji, w których dawcą jest świnia. Natomiast jak wskazuje Autor, mało jest danych literaturowych na temat oddziaływania czynników restrykcyjnych na cykl życiowy wirusa PERV oraz wskazujących na profil ekspresji w zakażonych komórkach. Formułując cele pracy Doktorant słusznie zauważa, że uzyskane wyniki mogłyby pomóc w dobrze markera prognostycznego zakażenia retrowirusem PERV, a w konsekwencji wspomóc opracowanie strategii terapeutycznych zakażenia PERV.

Autor sformułował w sposób prawidłowy i przejrzysty dwa cele pracy: ocenę infekcyjności retrowirusów PERV w układzie kokultury komórek modelowych hodowanych w warunkach standardowych oraz w warunkach stanu zapalnego oraz ocenę genów uczestniczących w procesie obrony komórkowej w obecności działania czynnika prozapalnego jak i przy jego braku. Autor w celu pracy pokusił się również o wytypowanie mRNA które posiadałoby wartość diagnostyczną w monitorowaniu zakażeń retrowirusami. Zwiększa to niewątpliwie atrakcyjność przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej, wskazując że uzyskane wyniki mogą mieć nie tylko charakter poznawczy mechanizmów obrony ale posiadają potencjał do tego aby znaleźć zastosowanie praktyczne.

Rozdział „Material i Metody” w sposób przejrzysty objaśnia szczegóły metodyczne pracy. Opis materiałów i metod poprzedzony został schematem przebiegu eksperymentu. Ponieważ w pracy przyjęto kilka grup badanych oraz zastosowano zaawansowany warsztat metod badawczych umieszczenie takiego schematu znacznie ułatwia zrozumienie przebiegu badań i założeń eksperymentu. Badania prowadzone były na komórkach ludzkich fibroblastów skóry linii NHDF hodowanych w monokulturze bez indukcji czynnikiem zapalnym oraz po indukcji LPS. Podobny schemat został przyjęty dla komórek hodowanych w kokulturze, gdzie zastosowano prawidłowe komórki nabłonkowe nerki świni (linia PK 15), dzięki czemu komórki NHDF zostały poddane ekspozycji na zakażenie endogennymi retrowirusami świni

PERV. Warto zwrócić uwagę, że w przypadku hodowli komórek w kokulturze, dla oceny infekcyjności i aktywności transkrypcyjnej genów uczestniczących w naturalnej obronie przed zakażeniem PERV, przed pobraniem komórek NHDF do badań hodowano je jeszcze dodatkowo przez jeden dzień po usunięciu czynnika infekcyjnego (komórek PK 15) i wymianie medium, aby wykluczyć, że odpowiedź komórkowa może być wynikiem wspólnej hodowli świńskich i ludzkich komórek. 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 pracy zaprezentowano szeroki i w pełni satysfakcjonujący warsztat metodyczny, poprzez zastosowanie metod zarówno jakościowej jak i ilościowej oceny ekstraktów kwasów nukleinowych. Celem wykazania integracji retrowirusów PERV-A, PERV-B, PERV-C z genomem komórek linii NHDF, Autor zastosował reakcję QPCR monitorując ilość reakcji w czasie jej trwania oraz QRT-PCR, który umożliwia monitorowanie przyrostu produktu w każdym kolejnym cyklu trwania reakcji, co ma istotne zastosowanie w diagnostyce medycznej. Oprócz oceny ilościowej w prowadzonych przez siebie badaniach wykonał ocenę specyficzności reakcji PCR na podstawie analizy krzywych temperatury topnienia oraz alternatywną metodą elektroforezy. Wykorzystał również nowoczesną metodę analizy profilu ekspresji genów techniką mikromacierzy oligonukleotydowych. Wszystkie metody badawcze zostały właściwie dobrane, gwarantując rzetelność uzyskanych wyników.

Wyniki badań autor zestawiał w 13 tabelach i na 9 rycinach omawiając je w następującej kolejności:

- Ocena infekcyjności retrowirusów – ilościowa detekcja retrowirusów PERV w komórkach NHDF
- Analiza transkryptomów komórek NHDF – analiza ekspresji genów uczestniczących w naturalnej odpowiedzi komórek NHDF przed zakażeniem retrowirusami PERV, zarówno w obecności jak i braku dodatkowego czynnika zapalnego LPS.

Warto zaznaczyć, że zastosowany podział powoduje, że omówienie wyników jest przejrzyste i zachowuje logiczny ciąg myślowy. Analizując uzyskane wyniki Doktorant zauważa, że infekcyjność PERV w stosunku do komórek NHDF jest zależna od warunków hodowli. Podkreśla również, że hodowla komórek w obecności LPS zmienia aktywność transkrypcyjną genów, co może wskazywać na uruchamianie naturalnych mechanizmów obronnych przed zakażeniem retrowirusem PERV w wyniku indukcji LPS. Wyniki zostały omówione przez autora w sposób zwięzły i wyczerpujący, a umieszczone w tekście tabele i ryciny są pomocne w analizie danych.

W rozdziale Dyskusja Autor podejmuje udaną, moim zdaniem, próbę interpretacji otrzymanych rezultatów w odniesieniu do danych literatury światowej. Jednocześnie Doktorant stawia, zwłaszcza w pierwszej części rozdziału, ciekawe i inspirujące pytania, jak chociażby to dotyczące realnego zagrożenia wynikającego z transmisji retrowirusów PERV *in vivo*. Dyskutuje problem możliwości bezpiecznej eliminacji PERV z genomu dawcy oraz ewentualne

konsekwencje takich zabiegów. Wreszcie najważniejsze pytanie dotyczy tego czy w przypadku braku możliwości całkowitego usunięcia PERV z komórek, tkanek i narządów dawcy, poznanie mechanizmów obronnych pozwoli skutecznie zablokować możliwość transmisji retrowirusów i umożliwi jednocześnie poszerzenie warsztatu nowoczesnej diagnostyki dla oceny infekcyjności i inwazyjności oddziaływania PERV. W dyskusji Doktorant umiejętnie zestawia argumenty z otrzymanymi wynikami, podejmując próbę ich interpretacji w oparciu zarówno o doświadczenia własne jak i w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych. Podobnie jak cele pracy również część dyskusyjna podzielona została na dwie części. W jednej Autor omawia zagadnienia dotyczące infekcyjności retrowirusów PERV, a w drugiej dyskutuje możliwości oceny aktywności transkrypcyjnej genów uczestniczących w naturalnej obronie przed PERV. Dzięki takiemu podziałowi zachowany zostaje jednolity układ całej rozprawy, a sama dyskusja jest czytelna.

Doktorant przedstawia trzy szczegółowe wnioski końcowe, dobrze udokumentowane rezultatami badań. Autor stwierdza, że infekcyjność PERV w stosunku do komórek NHDF jest zależna od warunków hodowli. Wnioskuje ponadto, że LPS zmienia aktywność transkrypcyjną genów uczestniczących w naturalnej obronie przeciwko retrowirusom PERV, włączając komórkowe mechanizmy obronne. Wysuwa również praktyczny wniosek wskazujący, że nadekspresja TRIM22 oraz TRIM 2 mogą być przydatnym markerem w diagnostyce zakażenia retrowirusami PERV. Wnioski jakie Doktorant prezentuje w swojej rozprawie 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. Tematyka badań jaka została zaprezentowana przez Doktoranta jest bardzo istotna ze względów poznawczych oraz praktycznych. Chociaż Doktorant we wstępie nakreśla praktyczne znaczenia jakie mogą mieć tego rodzaju badania wobec wyzwań ksenotransplantacji, sugerowałbym jednak silniejsze zaznaczenie tego aspektu dla podkreślenia jak istotne znaczenie kliniczne mogą mieć badania prowadzone przez Autora.

2. Sugerowałbym, żeby schemat przebiegu eksperymentu (Ryc. 14) umieszczony został w sekcji materiał i metody tak żeby był jego integralną częścią. W chwili obecnej jest on umieszczony na stronie poprzedzającej sekcję materiał i metody.

3. W omówieniu wyników w Tab. III i IV sugerowałbym umieszczenie wyniku negatywnego dotyczącego PERV-C w powyższych tabelach, zostało to wprawdzie omówione w tekście jednak dla przejrzystości warto by również umieścić ten wynik w tabelach.

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że przedstawioną mi do recenzji pracę 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. Krzysztofa Łopaty pt.: „Profil ekspresji genów uczestniczących w naturalnej obronie komórek NHDF przed zakażeniem endogennymi wirusami świni” spełnia wszelkie wymogi rozprawy na stopień doktora nauk medycznych zgodnie z art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 ). Zwracam się wobec tego do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenia Pana mgr. Krzysztofa Łopaty 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. Krzysztofa Łopaty ze względu na jej istotny walor poznawczy oraz praktyczny.

**KIEROWNIK**  
Pracowni Biotechnologii  
  
*dr hab. n. med. Piotr Wilczek*