



Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych
ul. Żeromskiego 7, 41-902 Bytom
tel/fax. +48 (32) 281 21 22, +48 (32) 39 63 286,
e-mail: internabytom@sum.edu.pl, www.sum.edu.pl

Bytom, dnia 07.06.2016r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Łopata

pt. „ Profil ekspresji genów uczestniczących w naturalnej obronie komórek NHDF przed zakażeniami endogennymi retrowirusami świni ”

Transplantologia jest wielkim sukcesem i jedną z najtrudniejszych dziedzin współczesnej medycyny. Jednak brak wystraszającej liczby organów lub tkanek do transplantacji od dawcy żywego lub zmarłego w stosunku do liczby oczekujących pacjentów stwarza konieczność poszukiwania alternatywnych metod pozyskiwania narządów. Jedną z tych metod jest ksenotransplantacja. Ksenotransplantacja według U.S. Public Health Service – to każda procedura, która obejmuje transplantację, implantację oraz infuzję ludzkiemu biorcy żywych komórek, tkanek lub organów pochodzących od zwierząt, a także ludzkich płynów ustrojowych, komórek, tkanek czy narządów, które weszły w kontakt *ex vivo* ze zwierzęcymi komórkami, tkankami lub narządami. Pod uwagę bierze się małpy naczelne – pawiany (*Papio sp.*) i szympany (*Pan troglodytes*), a także świnię domową (*Sus scrofa*). Mimo, że małpy są filogenetycznie najbliżej spokrewnione z ludźmi, to obecnie uważa się, że idealnym źródłem materiału biologicznego do ksenotransplantacji jest świnka domowa. Ma zbliżone parametry anatomiczne i fizjologiczne, np. zbliżona jest osmolarność moczu, wielkość filtracji kłębuszkowej i przepływ krwi przez nerki. Podobny jest także rzut minutowy serca i ciśnienie tętnicze. Niektóre hormony (insulina) oraz czynniki tkankowe (czynnik VIII krzepnięcia) pobrane od świni działają na organizm ludzki, co potwierdza ich zastosowanie w klinice. Perfuzja krwi przez wątrobę świńską pozwala na detoksykację chorych w śpiączce wątrobowej. Jednocześnie świnka jest gatunkiem o wysokiej plenności i płodności, tanim i łatwym w utrzymaniu, szybko rośnie, a jej organy w stosunkowo krótkim czasie osiągają wielkość i wydolność fizjologiczną wymaganą na potrzeby



ksenotransplantacji. Dodatkowo badania dotyczące międzygatunkowej homologii DNA człowieka oraz zwierząt wskazują na najwyższą homologię, wyjąwszy naczelne, między człowiekiem a świnia.

Analizując ryzyko związane z ksenotransplantacją wymienia się przede wszystkim: odrzucenie przeszczepu (znaczny dystans filogenetyczny pomiędzy dawcą i biorcą jest jednak powodem istotnych problemów immunologicznych) oraz infekcje międzygatunkowe.

W przypadku infekcji, największe zainteresowanie badaczy i klinicystów budzą endogenne retrowirusy świni stanowiące zagrożenie dla ludzi. Ich specyfika związana z trwałą integracją w genom gospodarza powoduje wiele obaw transplantologów.

Jak podkreśla Doktorant „ wirusem, który budzi szczególną troskę jest endogenny retrowirus świni –PERV (ang. Porcine Endogenous Retroviruses). Pomimo braku doniesień o zakażeniach komórek ludzkich *in vivo*, wirus ten jest zdolny do infekowania komórek ludzkich *in vitro*”. Pierwszą linię obrony po zakażeniu stanowią czynniki restrykcyjne – białka działające na różne etapy cyklu życiowego retrowirusów. Autor zwraca uwagę, jak mało jeszcze wiemy na temat profilu ekspresji tych czynników w komórkach zakażonych retrowirusami w warunkach standardowych i/lub stanu zapalnego. Dlatego jako cele przygotowanej rozprawy Doktorant wymienia:

- ocenę infekcyjności endogennych retrowirusów świni (PERV) w modelowym układzie kokultury komórek fibroblastów skóry ludzkiej z komórkami nabłonkowymi nerki świńskiej (NHDF/PK15) hodowanych w warunkach standardowych oraz warunkach stanu zapalnego wywołanego lipopolisacharydem bakteryjnym (LPS).
- ocenę aktywności transkrypcyjnej genów uczestniczących w naturalnej obronie komórek NHDF przed zakażeniem wirusami PERV w obecności i braku dodatkowego czynnika prozapalnego-LPS oraz wytypowanie mRNA mających wartość diagnostyczną w monitorowaniu zakażeń retrowirusowych.

Przedstawiona do recenzji praca liczy ogółem 129 stron z podziałem na 7 podstawowych rozdziałów. Pracę uzupełniają: Wykaz skrótów, Wykaz tabel i rycin, Streszczenia w języku polskim i angielskim oraz Aneks.



We Wstępie Autor szczegółowo charakteryzuje retrowirusy PERV: ich budowę, cykl życiowy, czynniki restrykcyjne tego cyklu. Omawia także strategie detekcji wirusa w ksenotransplantacjach (badanie trzody chlewnej oraz biorców po ksenotransplantacjach). Całość uzupełniają liczne ryciny, stanowiące cenne uzupełnienie zestawionych informacji. Przygotowany profesjonalnie Wstęp bardzo dobrze wprowadza Czytelnika w temat rozprawy. Brakuje w nim jednak podrozdziału dotyczącego ksenotransplantacji, zaczynając od definicji, poprzez krótki rys historyczny na możliwościach i ograniczeniach kończąc.

Materiałem do badań były prawidłowe ludzkie fibroblasty skóry (linia komórkowa NHDF). Hodowla NHDF była prowadzona w: monokulturze (kontrola), monokulturze w obecności LPS, kokulturze z prawidłowymi komórkami PK15 oraz kokulturze z PK15 po wcześniejszej obecności LPS w hodowli komórek NHDF. Słusznie w eksperymencie wykorzystane zostały fibroblasty, jako powszechnie występujące komórki w organizmach ludzkich. Poprzez produkcję macierzy zewnątrzkomórkowej zapewniają rusztowanie dla innych komórek, biorą udział w komunikacji międzykomórkowej, stanowią istotną część mechanizmu obronnego organizmu.

W dalszej części tego rozdziału Doktorant bardzo dokładnie i precyzyjnie opisał poszczególne etapy eksperymentu wykazując się dużą znajomością tematu: hodowlę komórek, ekstrakcję DNA i RNA z materiału badanego, ocenę jakościową i ilościową ekstraktów kwasów nukleinowych, ocenę specyficzności produktów powstałych w reakcji QPCR i QRT-PCR. Może lepiej byłoby zamieścić Ryc.14 ilustrującą schemat przebiegu eksperymentu w rozdziale Materiał (nie Materiały) i Metodyka, zamiast na zakończenie rozdziału Założenia i Cel pracy. Jednocześnie zgodnie z obowiązkami recenzenta, muszę zwrócić uwagę na brak rozdzielenia rozdziału trzeciego na dwa podrozdziały.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione na 23 stronach w sposób jasny i czytelny, ułatwiając Czytelnikowi dysertacji poruszanie się w kolejnych, złożonych analizach



zależności. Mają one wartości poznawcze i praktyczne. Kolejność prezentacji wyników była następująca:

- ocena infekcyjności retrowirusów (ilościowa detekcja retrowirusów PERV w komórkach NHDF).
- analiza transkryptomów komórek komórek NHDF (analiza profilu ekspresji genów uczestniczących w naturalnej odpowiedzi komórek NHDF przed zakażeniem retrowirusami PERV zarówno w obecności oraz braku dodatkowego czynnika zapalnego LPS. Opisową prezentację wyników Doktorant uzupełnił 10 tabelami i 11 rycinami, co stanowi dowód ich rzetelności a równocześnie bardzo ułatwia śledzenie wywodu w zasadniczych rozdziałach pracy. Wykresy i tabele są opisane w sposób prawidłowy .

Do opracowania wyników mgr Łopata wykorzystał prawidłowe metody statystyczne oraz profesjonalne programy komputerowe specyficzne do analizowanych danych. Interpretacja wyników nie budzi żadnych zastrzeżeń.

W Dyskusji Autor wykazał się dużą wiedzą z zakresu omawianego tematu. Przedstawiając endogenne wirusy jako „wielką zagadkę” mikrobiologii, biologii molekularnej, ksenotransplantologii mgr Łopata umiejętnie odpowiada na postawione przez siebie pytanie główne: „Czy można byłoby bezpiecznie wyeliminować PERV z genomu dawcy?” Proponuje jeszcze coś więcej, kontynuację badań z zastosowaniem autorskiego układu badawczego, które mogą przyczynić się do poszerzenia wiedzy o cyklu życiowym retrowirusa PERV.

W toku Dyskusji mgr Łopata umiejętnie i stopniowo odpowiada na postawione w celu pracy pytania, dokładnie analizując uzyskane wyniki i porównując je z danymi literaturowymi. Z zadania tego wywiązał się bardzo dobrze.

Doktorant bardzo dobrze posługuje się zestawionym piśmiennictwem, co świadczy o Jego bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym i naukowym. Piśmiennictwo – 205 pozycji, to



Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych
ul. Żeromskiego 7, 41-902 Bytom
tel/fax. +48 (32) 281 21 22, +48 (32) 39 63 286,
e-mail: internabytom@sum.edu.pl, www.sum.edu.pl

w zdecydowanej większości publikacje z ostatnich 10 lat, umiejętnie dobrane i prawidłowo cytowane w rozprawie. W zdecydowanej większości są to pozycje angielskojęzyczne.

Trzy wnioski odpowiadają na pytania postawione w celu pracy. Mają także walor praktyczny, szczególnie wniosek trzeci zawierający propozycję uzupełniającego markeru w monitorowaniu zakażeń retrowirusami PERV-A i PERV-B, a także w różnicowaniu monoinfekcji od koinfekcji wywołanej przez PERV i/lub bakterie Gram-ujemne.

Nieliczne przeliterowania oraz wcześniej przedstawione uwagi/wątpliwości absolutnie nie umniejszają bardzo wysokiej wartości dysertacji.

Sadzę, że rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Łopata jest oryginalnym opracowaniem bardzo istotnego i aktualnego problemu dotyczącego medycyny transplantacyjnej. Zawiera także elementy, które mogą być wykorzystane w bezpośredniej praktyce. Świadczy to o dojrzałości naukowej Autora, bardzo dobrej znajomości przedstawianego tematu i wyjątkowej umiejętności posługiwania się trudnym warsztatem pracy.

Należy również podkreślić konsekwencję, wyjątkową dokładność w przedstawianiu danych oraz rzetelność Doktoranta w dążeniu do uzyskania odpowiedzi na postawione pytania.

Uważam, że przedstawiona do recenzji praca mgr Krzysztofa Łopata w pełni spełnia warunki stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach wniosek o dopuszczenie mgr Krzysztofa Łopaty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie powyższej rozprawy.

prof. dr hab. n. med.
Małgorzata MUC - WIERZGOŃ
specjalista chorób wewnętrznych,
diabetologii i zdrowia publicznego

Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Muc-Wierzoń



Wydział Zdrowia Publicznego w Bytomiu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych
ul. Żeromskiego 7, 41-902 Bytom
tel/fax. +48 (32) 281 21 22, +48 (32) 39 63 286,
e-mail: internahytom@sum.edu.pl, www.sum.edu.pl

Bytom, dnia 07.06.2016r.

Wniosek

o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

mgr Krzysztofa Łopata

pt. „ Profil ekspresji genów uczestniczących w naturalnej obronie komórek NHDF przed zakażeniami endogennymi retrowirusami świni ”

Uzasadnienie:

1. Rozprawa doktorska jest profesjonalnie przygotowanym dziełem Autora, zawierającym nowatorskie i bardzo istotne badania z zakresu szeroko rozumianej medycyny transplantacyjnej.
2. Wnioski są wynikiem głęboko przemyślanych procedur badawczych uzyskanych na podstawie bardzo dobrze zaplanowanego i przeprowadzonego eksperymentu.
3. Doktorant proponuje kontynuację badań z zastosowaniem autorskiego układu badawczego, które mogą się przyczynić do poszerzenia wiedzy o cyklu życiowym retrowirusa PERV, a jednocześnie być pomocne w rozważaniach nad możliwościami i ograniczeniami ksenotransplantacji.
4. Częstkowe wyniki badań zostały wcześniej wysoko ocenione przez międzynarodowych ekspertów, co skutkuje dwoma publikacjami w czasopismach z listy filadelfijskiej, których mgr Łopata jest współautorem - Pol J Microbiol (IF 0.768) oraz Viruses-Basel (IF 3.353).

Prof. dr hab. n. med. **Małgorzata MUC-WIERZGON**
specjalista chorób wewnętrznych,
diabetologia
5367173