



**NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO
- PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY
ZAKŁAD WIRUSOLOGII**

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Te./Fax: (0 22) 542 13 85; Tel.: 542 12 30
e-mail: wiruspzh@pzh.gov.pl <http://www.pzh.gov.pl>

Ocena

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna zatytułowanej: "Zmienność regulatorowego genu *nef* ludzkiego wirusa upośledzenia odporności typu 1 występującego na terenie Polski południowej"

autorstwa

mgr Moniki Ziach-Terleckiej

Pracę doktorską Pani mgr Monika Ziach-Terlecka wykonała w Zakładzie Mikrobiologii i Wirusologii na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Przedstawiona rozprawa napisana została w układzie charakterystycznym dla prac doświadczalnych i składają się na nią następujące rozdziały: Wstęp, Założenia i Cel Pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Najważniejsze obserwacje oraz Wnioski. Do pracy dołączono Wykaz Skrótów, Wykaz Tabel i Rycin, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis piśmiennictwa obejmujący 149 pozycji. Łącznie 87 stron maszynopisu, w tym 3 tabele i 17 rycin.

Moja pierwsza uwaga dotyczy sformułowania tematu rozprawy. Dlaczego w tytule umieszczono "Zmienność regulatorowego genu *nef* ludzkiego wirusa upośledzenia odporności typu 1 występującego na terenie Polski południowej", chociaż znaczna liczba próbek pochodziła z Łodzi, która w żadnym wypadku nie jest zaliczana do Polski południowej? Jakie jest wytłumaczenie takiej kwalifikacji terytorialnej?

Tematyką pracy są zagadnienia dotyczące zakażeń HIV-1 a w szczególności zmienności genu regulatorowego *nef*, która może wpływać na przebieg zakażenia. Badania wykonano stosując techniki biologii molekularnej, których znaczenie w badaniach dotyczących epidemiologii chorób zakaźnych jest obecnie niepodważalne. Techniki te mają zastosowanie zarówno w śledzeniu dróg zakażeń, co jest niezbędne w programach eradykacji i eliminacji chorób (polio, odra, różyczka), gdyż pozwalają odróżnić zakażenia rodzime od importowanych jak również w trakcie opracowywania ognisk epidemicznych. Szczególnie istotne jest to w zakażeniach pokarmowych np. określanie czy zakażenie wzw A jest wywołane szczepem endemicznie krążącym w Polsce czy też nabyte w czasie podróży zagranicznej. Nie zastąpione są również techniki badań molekularnych w badaniach żywności pod kątek zakażeń wirusowych. Nie do podważenia jest znaczenie tych badań w określaniu lekooporności wirusów na stosowane leki przeciwwirusowe, w śledzeniu krążących szczepów wirusowych w tym wpływu wzajemnych relacji wirus-gospodarz na zmienność wirusów.

We Wstępie, zostały omówione przez doktorantkę najistotniejsze problemy dotyczące budowy i funkcji genu *nef* oraz jego produktu białka Nef (nazwa jest skrótem angielskiego określenia „negative factor”), które w istotny sposób wpływa na zakaźność wirusa i rozwój AIDS. Omówiona została również systematyka HIV, która obejmuje grupy, podtypy, podpodtypy, formy rekombinowane oraz ich rozmieszczenie geograficzne. Zwrócono uwagę na wysoką częstość mutacji HIV, szybkie tempo replikacji wirusa jak również na możliwość rekombinacji genetycznych w przypadku, gdy komórka zostaje zakażona dwoma wariantami wirusa i wskazano, że te cechy mogą wpływać na zmienność genetyczną wirusa. Z kolei zmienność genetyczna nie pozostaje bez wpływu na rozwój choroby. Podkreślono korelacje między szybkością rozwoju choroby a szczepem HIV, który wywołał zakażenie. W końcowym fragmencie Wstępu omówione zostały problemy znaczenia zmienności genetycznej HIV w świetle rozwoju AIDS, ze szczególnym uwzględnieniem roli genu *nef*. Doktorantka przytoczyła dane z piśmiennictwa wskazujące na istotne znaczenie produktu genu *nef* na szybkość rozwoju choroby. Wskazano, że u osób z delecją tego genu nawet po 16 latach od zakażenia stwierdzano stały poziom komórek CD4 oraz niewykrywalny poziom wirerii. Logicznie ułożone informacje zawarte we Wstępie pracy doprowadziły do sformułowania celu pracy, który został zawarty w 4 podpunktach.

W rozdziale Materiały i Metody doktorantka w rzetelny sposób opisała otrzymany materiał do badań oraz stosowane metody. W przyszłości w tytule rozdziału proponowałabym stosowanie słowa ‘Materiał’ a nie ‘Materiały’, aby uniknąć błędu często popełnianego przez

autorów prac. Metody zostały odpowiednio dobrane w odniesieniu do zaplanowanego celu i podkreślić należy umiejętność zastosowania metod statystycznych, które pomogły w odpowiednim opracowaniu i interpretacji uzyskanych przez autorkę wyników badań.

Wyniki badań zostały zawarte w dwóch tabelach i przedstawione na 15 rycinach, a następnie szczegółowo omówione i przedyskutowane. Autorka na podstawie badania sekwencji genu *nef*, potwierdziła wcześniejsze informacje dotyczące jednorodności systematycznej HIV krążącego na terenie Polski. Wyniki oznaczeń wykazały, że 100% sekwencji *nef* wskazuje na przynależność wirusa do podtypu B, co świadczy o jego dominacji. Tak niskie zróżnicowanie genu *nef* krążącego wśród osób zakażonych HIV sugeruje, że w Polsce mieliśmy do czynienia z pojedynczą transmisją wirusa, a następnie miało miejsce szerzenie się zakażenia w zamkniętej populacji. Potwierdzeniem tego są wyniki badań sekwencji genu *nef* i odniesienie ich do sekwencji konsensusowej dla podtypu B wirusa, co wykazało bliskie pokrewieństwo badanych sekwencji i wskazuje na lokalny charakter epidemii HIV w Polsce.

Ciekawą informacją wynikającą z otrzymanych wyników jest wykazanie, że większe zróżnicowanie sekwencji genu *nef* występuje wśród osób seropozytywnych dla HIV z wczesnym zakażeniem, niż u osób z zakażeniem długotrwałym. Wydawałoby się, że powinno być odwrotnie, biorąc pod uwagę dużą zmienność wirusa wywołaną częstymi mutacjami, które prowadzą do większego zróżnicowania HIV w organizmie w czasie długotrwałego zakażenia. Dyskusja przeprowadzona przez doktorantkę, z powołaniem się na informacje zawarte w zacytowanym piśmiennictwie, w jasny sposób tłumaczy przyczynę tego zjawiska. Mianowicie, osoby z długotrwałym zakażeniem z silniej zróżnicowanym wirusem, których liczba w populacji się zwiększa, stanowią źródło zakażenia dla osób wrażliwych na zakażenie HIV, co skutkuje większym zróżnicowaniem wirusa wśród osób nowo zakażonych.

Przeprowadzone przez doktorantkę badania doprowadziły do wykrycia 14 zmian nukleotydowych w sekwencji genu *nef* z czego 7 miało wpływ na kodowane aminokwasy. Wykrycie zmian, które ewentualnie mogą mieć wpływ na przebieg zakażenia narzuca pytanie, czy doktorantka sięgnęła do informacji dotyczących tych osób długotrwanie zakażonych, na temat danych klinicznych dotyczących przebiegu choroby. Czy te zmiany genetyczne w sekwencji nukleotydowej *nef*, które rzutują na zmiany w aminokwasach miały jakiegokolwiek znaczenie biologiczne, ewentualnie wpływ na przebieg choroby? Informacje te w znacznym stopniu wzbogaciłyby wartość rozprawy.

Otrzymane wyniki badań, ich przedyskutowanie w oparciu o piśmiennictwo pozwoliły doktorantce na podsumowanie wyników w punktach jednoznacznie wskazujących na to, że

autorka uzyskała odpowiedź na każdy z postawionych celów. Na pochwałę zasługuje również sformułowanie wniosków, które nie stanowią streszczenia wyników, co niestety zdarza się dosyć często.

Mam jednak kilka uwag, które nie wpływają na pozytywną ocenę pracy, ale wskazują na konieczność większego zwracania uwagi przez doktorantkę na dokładność w używaniu pewnych sformułowań. 1. Konieczne jest stosowanie jednolitego nazewnictwa, zgodnego z systematyką wirusa. Jeżeli mowa o podtypie B, to nie nazywamy go wariantem, bo to nie odpowiada prawdzie; nie mówimy o szczepach C, G (są to podtypy) lecz o szczepach należących do podtypu C, G; 2. nie wiem co autorka miała na myśli używając określenia 'forma wirusa'; 3. jeżeli używamy skrótovej formy nazwy wirusa, to piszemy HIV a nie wirus HIV bo w skrócie zawarte jest słowo wirus; 4. mówimy o liczbie komórek, o liczbie kopi a nie o ilości; 5. nie jest prawidłowy termin 'dożylnie zażywanie narkotyków', możemy mówić o zażywaniu narkotyków ale jeżeli uwzględniamy drogę podawania to w przypadku drogi dożylniej powinno się użyć sformułowania 'stosowanie' względnie 'podawanie' a nie 'zażywanie'; 6. termin infekcja zamiast zakażenie wszedł już do powszechnego użycia w języku polskim ale nadal prawidłowe jest stosowanie słowa 'zakazić', a nie 'zainfekować komórki, osoby, organizmy...' względnie 'zakażone' a nie 'zainfekowane komórki, osoby, organizmy...'; 7. szkoda, że na 149 zacytowanych pozycji piśmiennictwa jedynie 19 pochodzi z ostatnich lata, 2013 - 2014 (niecałe 13%).

Powyższe uwagi w żaden sposób nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej i wnioskuję o dopuszczenie mgr Moniki Ziach-Terleckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

