

# INSTYTUT GRUŹLICY I CHORÓB PŁUC

Zakład Mikrobiologii

Krajowe Referencyjne Laboratorium Prątka Gruźlicy

Kierownik Prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć

01-138 Warszawa ul. Płocka 26

Tel./ fax. + 22 4312182, e- mail: [e.kopec@igichp.edu.pl](mailto:e.kopec@igichp.edu.pl)



---

Warszawa, 20.10.2016 r.

Prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopeć

Kierownik Zakładu Mikrobiologii IGiCHP

Warszawa ul. Płocka 26

## Recenzja

**pracy doktorskiej magistra Piotra Kruszyńskiego pt.: " Analiza zmienności w obrębie genu *env* szczepów ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1 występujących na terenie Polski,,**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska dotyczy bardzo istotnego problemu zdrowotnego, jakim są zakażenia wywołane przez wirus nabytego niedoboru odporności typu I (HIV -1).

W ciągu ostatnich 30 lat można było zaobserwować ogromny postęp, jaki dokonał się w poznaniu patomechanizmu zakażenia wirusem HIV. Postęp ten dotyczy również nowych leków i nowych schematów terapeutycznych, które w znaczący sposób zmieniły przebieg choroby. W codziennej praktyce klinicznej spowodowało to przede wszystkim znaczne obniżenia odsetka śmiertelności, zmianę jakości życia oraz wzrost jakości opieki nad osobami żyjącymi z HIV.

W budowie kulistej cząsteczki wirusa można wyróżnić otoczkę lipoproteinową zawierającą glikoproteinę gp160, składającą się z dwóch segmentów: gp120 i gp41. Pod tą osłonką znajduje się warstwa zbudowana z białka p24 zwana kapsydem, która otacza materiał genetyczny wirusa oraz białka: odwrotną transkryptazę, integrazę, proteazę i nukleoproteiny. Charakterystyczną cechą wirusa HIV-1 jest duża zmienność antygenowa. Przyczyną tej zmienności są błędy w aktywności odwrotnej transkryptazy oraz brak mechanizmów ją korygujących. Różnica w składzie aminokwasów kodowanych przez gen *env* w szczepach wirusa może wynosić nawet do 20%. Cecha ta powoduje, że wirus HIV-1 może unikać

odpowiedzi immunologicznej gospodarza, a dotyczy to przede wszystkim przeciwciał neutralizujących.

Podstawą zakażenia cząsteczką wirusa jest interakcja glikoprotein osłonki wirionu ze specyficznym białkowym receptorem komórkowym, którym jest cząstka CD4+, Dlatego komórki wykazujące ekspresję tego receptora, do których należą limfocyty Th, monocyty i makrofagi, zostają zakażone jako pierwsze. Po związaniu wirusa przez cząsteczkę CD4 białko gp120 przechodzi zmianę konformacyjną, ułatwiającą wiązanie, do koreceptora. Dwoma głównymi koreceptorami dla HIV-1 są receptory chemokin CCR5 i CXCR4.

Po wniknięciu do komórki dochodzi do odpłaszczenia wirionu. Proces replikacji zaczyna się podczas odwrotnej transkrypcji, kiedy transkryptaza przepisuje informacje zawarte w wirusowym RNA na pojedynczą nić DNA (ssDNA), która transportowana jest z cytoplazmy do jądra komórkowego. Dzięki aktywności integrazy wirusa oraz enzymów reperacyjnych DNA gospodarza dochodzi do wbudowania wirusowego DNA kodującego białka wirusa z DNA gospodarza. Ta integracja jest nieodwracalna, a komórka staje się potencjalnym producentem wirusa HIV-1. Replikacja HIV-1 jest procesem niezwykle dynamicznym, nawet w bezobjawowej fazie zakażenia, gdyż każdego dnia powstaje około 1000 nowych cząstek wirusowych. Wysoka zmienność genetyczna HIV obserwowana in vivo jest konsekwencją zachodzenia mutacji punktowych oraz rekombinacji w trakcie cyklu replikacyjnego wirusa. Mutacje te są przyczyną rozwoju lekooporności wirusa na leki antyretrowirusowe i zdolność ucieczki spod kontroli układu immunologicznego.

Genetyczne różnice między izolatami HIV-1 stanowią obecnie podstawę klasyfikacji wirusa, a śledzenie rozprzestrzeniania się poszczególnych wariantów pozwala na monitorowanie rozwoju epidemii i dostarcza ważnych informacji na temat czasu i sposobu transmisji wirusa do różnych krajów, regionów geograficznych lub populacji. Z drugiej strony olbrzymia różnorodność form genetycznych wirusa utrudnia diagnostykę infekcji, może wpływać na wrażliwość HIV-1 na leki i stanowi poważną przeszkodę w badaniach zmierzających do stworzenia skutecznej szczepionki.

Praca mgr Piotra Kruszyńskiego dotyczy badań genetycznego zróżnicowania wirusa HIV-1. Wybór tematu pracy przez Doktoranta należy ocenić wysoko, jako zasadny naukowo i pożądany ze względu na charakter aplikacyjny wyników do praktyki klinicznej. Badania te mają ogromne znaczenie w prawidłowej diagnostyce zakażenia wirusem i aplikacji choremu prawidłowej terapii antywirusowej. Monitorowanie zróżnicowania genetycznego jest poza

tym niezbędnym narzędziem w śledzeniu transmisji zakażenia na poziomie lokalnym i światowym. Badania zastosowane przez Doktoranta w pracy mieszczą się w głównym nurcie badań prowadzonych na świecie, związanych z opracowaniem nowych, wiarygodnych metod genetycznego typowania drobnoustrojów. Największe zróżnicowanie genetyczne dotyczy genu *env*, kodującego osłonowe glikoproteiny gp 41 i gp120, które odpowiedzialne są za wnikanie wirusa do komórki. Podjęte przez Doktoranta badania dotyczą przede wszystkim analizy molekularnej sekwencji tego genu w obrębie wysoce zmiennego regionu kodującego pętlę V3. Znajomość tej sekwencji pozwala na określenie powinowactwa wirusa do koreceptorów i zastosowanie właściwej terapii w leczeniu chorego. Badania zaplanowane przez Autora doskonale wpisują się w główny nurt badań Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Wirusologii pod Kierownictwem Profesora Tomasza J. Wasika, który od wielu lat zajmuje się w Polsce zagadnieniami dotyczącymi wirusowych i osobniczych czynników modyfikujących patogenezę wirusa HIV.

Układ pracy jest typowy, zawiera wszystkie rozdziały przyjęte zwyczajowo w pracach doktorskich. We wstępie Autor opisuje wiele aspektów dotyczących zakażeń wywołanych przez wirusa HIV-1 – poprzez budowę i znaczenie wirusowych glikoprotein osłonkowych i ich znaczenie w zakażeniu komórki gospodarza, klasyfikacji szczepów HIV-1 i ich tropizmu do zakażanych komórek oraz wpływu określonych mutacji na oporność wirusa na leki.

Celem pracy mgr Piotra Kruszyńskiego było określenie za pomocą metod molekularnych powinowactwa wirusa HIV-1 do koreceptorów oraz stwierdzenie, czy istnieje korelacja pomiędzy stwierdzonym powinowactwem, a etapem zakażenia chorego i określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy sekwencjami genu *env* szczepów wirusa w zależności od drogi i etapu zakażenia oraz powinowactwa do koreceptorów.

Cele pracy wytyczają kierunek prowadzenia badań.

Materiał do badań stanowiła żylna krew obwodowa pobrana w latach 2008 – 2010 (w czterech ośrodkach diagnostyczno -terapeutycznych w Chorzowie, Krakowie, Wrocławiu i Łodzi) od 101 chorych HIV-1 seropozytywnych, którzy nie przyjmowali leków przeciw retrowirusowych. W badanej populacji dominowali mężczyźni 83,3 %. Najmłodszy pacjent miał 19 lat, najstarszy 57, mediana 29 lat. W badanej grupie zakażenie wczesne stwierdzono u 19 % pacjentów a zakażenie dawne u 81 %.

Analiza porównawcza sekwencji referencyjnych wirusa HIV- 1 wykazała, że dominującym wariantem był podtyp B (>90%). W badaniach zaplanowanych przez Doktoranta na podstawie analizy sekwencji nukleotydowych kodujących pętlę V3 gp 120 wirusa HIV- 1 wyznaczano powinowactwo do koreceptorów.

Doktorant stwierdził w pracy, że stosując różne metody wyznaczania powinowactwa przy użyciu wszystkich narzędzi badawczych dla 49 szczepów izolowanych od pacjentów zakażonych wirusem HIV-1 ustalił powinowactwo z koreceptorem CCR5 natomiast dla 47 szczepów z koreceptorem CXCR4. Szczepy wykazujące powinowactwo do koreceptora CXCR4 izolowano tylko od pacjentów z dawnym zakażeniem.

**Mam pytanie do Doktoranta, jakie konsekwencje w nowoczesnej terapii niesie ze sobą tak znaczne powinowactwo w populacji pacjentów zakażonych wirusem HIV-1 do koreceptora CXCR4?**

**Jakie metody według przeprowadzonych przez Doktoranta badań powinny być referencyjne w celu określenia powinowactwa szczepów wirusa HIV-1 do koreceptora ?**

Doktorant przeanalizował również w swoich badaniach powiązania filogenetyczne pomiędzy szczepami wirusa wyizolowanymi od 96 pacjentów. Przeprowadzone molekularne dochodzenie epidemiologiczne wykazało obecność 5 klastrow posiadających takie same wzory molekularne w obrębie analizowanych czterech sekwencji reprezentujących podtyp B HIV-1. Cztery klastry tworzyły pary sekwencji, a w przypadku jednego klastra były to trzy sekwencje. Wszyscy pacjenci zakażli się na drodze kontaktów homoseksualnych, a analiza danych demograficznych i epidemiologicznych nie wykluczała ich bliskiego kontaktu.

**Czy na podstawie przeprowadzonych badań Doktorant mógłby zaproponować algorytm molekularnych dochodzeń epidemiologicznych w grupie pacjentów HIV-1 seropozytywnych?**

Cele pracy zostały zrealizowane i podsumowane w rozdziale Obserwacje i Wnioski.

**Proszę Autora o wyjaśnienie: w wynikach na stronie 57 stwierdzono, że powinowactwo do koreceptora CXCR4 dotyczyło tylko pacjentów z dawnym zakażeniem natomiast w rozdziale Obserwacje nr 1 dotyczą innej grupy chorych ?**

Dyskusja wyników zawarta jest w 19 stronicowym omówieniu. Doktorant w sposób dojrzały odnosi własne wyniki do badań innych autorów.

Doktorant w dyskusji str. 69 stwierdza, że nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy czasem zakażenia, drogą transmisji, rokiem zdiagnozowania zakażenia, płci, średniego wieku i że czynniki te nie wpłynęły na wyniki zróżnicowania genu *env* pomiędzy pacjentami na różnym etapie zakażenia,

**Proszę Doktoranta o wyjaśnienie czy znane są prace badawcze w których stwierdzono wpływ ww czynników na zróżnicowanie genu *env* ?**

Praca mgr Piotra Kruszyńskiego zawiera bogaty spis cytowanego piśmiennictwa - 188 pozycji. Jest to nowe, wartościowe, dobrze wybrane piśmiennictwo, pochodzące głównie z ostatnich lat.

Na koniec mojej recenzji chcę podkreślić dużą staranność w przygotowaniu pracy, która napisana jest poprawnym językiem, ilustrowana dobrze przygotowanymi graficznie tabelami i rycinami.

Przed przygotowaniem przez Doktoranta pracy do druku proponuję wprowadzenie kilku zmian merytorycznych i redakcyjnych.

### **Wstęp**

Proszę Autora o wyjaśnienie wydajności transmisji? str 13

### **Materiały**

Tabela nr 2 proponuję rozdzielić w kolumnach informacje zawarte w tytule pierwszej kolumny

### **Wyniki**

#### **Tabela 2**

Część danych stanowią materiały: wiek, płeć, a część stanowią wyniki: pacjenci z wczesnym i dawnym zakażeniem, proszę o rozdzielenie tych danych

Str 52

Na drzewie sekwencje utworzyły skupisko z sekwencjami referencyjnymi?, proszę to opisać w bardziej zrozumiały sposób dla Czytelnika

Brak opisu tabeli 4

Proszę o wyjaśnienie danych zawartych w rycinach 15 i 16 i co z nich wynika dla przedstawionych przez Doktoranta badań.

**Proszę o korektę danych:**

Str 47 12 wiersz od dołu

61 pacjentów zakażonych przez kontakty homoseksualne, 23 hetero, 5 przez stosowanie środków odurzających **nie zgadza się z liczbą pacjentów umieszczoną w streszczeniu** str. 101 63 kontakty homoseksualne, 25 hetero i 6 środki odurzające.

### **Dyskusja**

Str. 69

8 wiersz od góry niższym udziałem kobiet to znaczy jaki %?. Nie znalazłam w pracy

Str. 71

Czy na podstawie trzech przypadków pacjentów zakażonych HIV-1 podtyp A1w prezentowanej pracy możemy cokolwiek wnioskować?

W posumowaniu oceny pracy magistra Piotra Kruszyńskiego pt.: ” Analiza zmienności w obrębie genu env szczepów ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1 występujących na terenie Polski” pragnę podkreślić, iż praca stanowi oryginalny dorobek naukowy Doktoranta i jest dowodem, umiejętności planowania i realizowania badań naukowych.

Moje uwagi nie umniejszają w niczym wysokiej wartości pracy, którą oceniam bardzo dobrze. Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską uważam, że ambitne cele rozprawy doktorskiej zostały w pełni osiągnięte, a uzyskane wyniki należy uznać za oryginalne i bardzo wartościowe.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w 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. nr 65, poz. 5 z późn. zm.).

Pracę przedstawioną mi do recenzji oceniam bardzo pozytywnie, Zwracam się do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie Doktoranta mgr Piotra Kruszyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**Z poważaniem**

**prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopec**

