



Recenzja pracy doktorskiej Piotra Kruszyńskiego "Analiza zmienności w obrębie genu *env* szczepów ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1 występujących na terenie Polski.", promotor dr hab. n. med. Tomasz Wąsik, prof. nadzw. SUM.

Recenzent: prof. dr. hab. n. med. Miłosz Parczewski, Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Nabytych Niedoborów Immunologicznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie.

Wstęp

Epidemiologia molekularna w zakażeniu HIV-1 jest jednym z kluczowych narzędzi do oceny rozprzestrzeniania zakażeń i ich charakterystyki, włączając charakter genotypowej lekooporności, tropizm oraz filodynamikę, która pozwala na modelowanie pochodzenia czy dynamiki transmisji. Badania molekularne nad zmiennością HIV-1 pozwalają na uzyskanie istotnych danych epidemiologicznych, ale również przyczyniają się do identyfikacji ognisk nowych zakażeń, co pozwala na projektowanie interwencji. Podstawą do badań są dane sekwencyjne, gromadzone w międzynarodowych bazach danych i powiększające zasób wiedzy wirusologicznej. Tropizm HIV-1 - powinowactwo krążących pseudoszczepów do koreceptorów jest związany z przyłączeniem glikoprotein powierzchniowych do receptorów chemokin CCR5 (tak zwane szczepy R5 tropowe) lub CXCR4 (tropizm X4). Możliwe jest również występowanie tropizmu dwureceptorowego (tropizm mieszany; określane jako DM lub R5X4). Typowa ewolucja tropizmu w trakcie trwania zakażenia przebiega od R5 do X4, niemniej możliwe jest pierwotne zakażenie wariantami X4 lub DM-tropowymi. Analizy tropizmu są istotne klinicznie, gdyż obecność szczepów X4 i dual-tropowych jest związana z szybszym spadkiem liczby limfocytów CD4; również terapia inhibitorem CCR5 - marawirokiem jest możliwa wyłącznie w przypadkach gdy nie stwierdza się obecności szczepów o tropizmie nie-R5.

W ramach analizowanej pracy doktorskiej autor podejmuje się trudnego i ambitnego zadania przeprowadzenia badań porównawczych pomiędzy narzędziami bioinformatycznymi używanymi do przewidywania tropizmu HIV-1. Do tego celu używane były sekwencje genu *env*. Dodatkowo przeprowadzono nowatorskie i ciekawe analizy filogenetyczne. Dobór problematyki jest wysoce trafny, gdyż zagadnienia bioinformatycznego przewidywania

funkcji na poziomie molekularnym, przy użyciu sekwencji kwasów nukleinowych wymagają ciągłego doskonalenia i mogą w przyszłości pozwalać na coraz trafniejszy dobór opcji terapeutycznych. Po optymalizacji metod bioinformatycznych badania nad HIV-1 mogą być rozszerzane na inne wirusy. Oryginalny wkład pracy doktorskiej dotyczy z jednej strony analiz tropizmu HIV-1 z dotychczas nie analizowanych południowych i centralnych regionów Polski; na szczególną uwagę zasługuje również oznaczanie tropizmu u osób z wczesnym zakażeniem HIV-1.

Ocena metodologiczna i merytoryczna pracy

Praca doktorska liczy 104 strony i ma typowy układ pracy doktorskiej zawierający wstęp, cele, metodologię, dyskusję, wnioski oraz piśmiennictwo; struktura pracy jest przejrzysta i skonstruowana prawidłowo. Przed wnioskami umiejętnie zawarty jest podrozdział "Obserwacje" który stanowi kontekst z którego wysnuwane są wnioski. Wstęp pracy doktorskiej jest obszerny i szczegółowy. Szczegółowo opisana jest struktura i rola glikoprotein osłonkowych HIV-1, włączając interakcje z koreceptorami i zależnością pomiędzy zmiennością tej struktury a powinowactwem do koreceptorów. Z punktu widzenia naukowego, szczególnie ciekawą częścią wstępu są szczegóły dotyczące interakcji poszczególnych pętli hiperzmiennych z CCR5/CXCR4, wzorowo są opisane przyczyny zmiany powinowactwa do koreceptorów. Kolejną istotną a rzadko podsumowywaną częścią wstępu jest zmienność molekularna HIV-1 związana z opornością na marawirok i inhibitory fuzji. Choć fuzeon jest aktualnie praktycznie stosowany w wyjątkowych przypadkach to mechanizm selekcji oporności na ten lek jest istotny właśnie z powodu stosowania go u pacjentów trudnych, często uprzednio wielokrotnie eksponowanych na leki antyretrowirusowe i z lekoopornością na inne klasy leków. Krótki podrozdział na temat filogenetyki wprowadza czytelnika w zagadnienia ewolucji HIV. Podsumowując, wstęp jest napisany ciekawie, ilustrowany kolorowymi rycinami, stanowi podstawę dla celów pracy i wprowadza do metodologii.

Cele pracy sformułowane są prawidłowo, szerokie i powiązane logicznie z wnioskami pracy doktorskiej. Autor podejmuje się analizy tropizmu do koreceptora na podstawie analizy sekwencji V3 i ocenia jej ewolucję/zmienność na etapie wczesnym i późnym zakażenia oraz dokonuje porównania różnych metod przewidywania tropizmu. Dodatkowo podjęta jest próba określenia subtypu HIV-1 na podstawie uzyskanych sekwencji, a także analiz

filogenetycznych. Cele pracy są ambitne i wskazują na pewność doktoranta w stosowaniu opisywanych metod.

Materiał i metodologia pracy: Badania zostały przeprowadzone na grupie 101 pacjentów, której wielkość w kontekście przeprowadzanych w pracy doktorskiej analiz uważam za odpowiednią. Badanie uzyskało stosowną zgodę komisji bioetycznej (numer 3/2007 - NIZP-PZH, KNW/0022/KB/218/13 - SUM w Katowicach). Na szczególną uwagę zasługuje włączenie do grupy badanej materiału uzyskanego od dziewiętnastu osób z wczesnym zakażeniem HIV. Zakażenie wczesne potwierdzano testem immunoenzymatycznym Lag-avidity ELA, co pozwalało na określenie czy zakażenie trwa <130 dni. Identyfikacja osób z niedawnym zakażeniem HIV-1 jest trudna, gdyż są to w dużej mierze osoby klinicznie bezobjawowe lub skąpoobjawowe, dlatego włączenie tej podgrupy do badań tropizmu jest niezwykle ciekawe. Uważa się, że w znakomitej większości przypadków we wczesnym zakażeniu dominują warianty R5 z następową ewolucją w kierunku X4. Oznaczanie tego parametru w grupie osób z zakażeniem wczesnym pozwala więc na potwierdzenie powyższej teorii oraz na obserwacje po jakim czasie dochodzi do zmiany tropizmu (u pacjentów nieleczonych).

Metodologia oznaczeń molekularnych była oparta na prowirusowym DNA z oznaczaniem tropizmu metodą sekwencjonowania populacyjnego, co stanowi jedną z niewielu ograniczeń pracy. Tropizm HIV przy użyciu sekwencjonowania metodą Sangera oznacza się typowo przy użyciu RNA, stąd pytanie recenzenta dlaczego doktorant jako materiał wybrał prowirusowe DNA. Pozostała metodologia pracy jest wzorowa. Algorytmy stosowane do przewidywania tropizmu są opisane bardzo szczegółowo. Doktorant wykazuje się biegłą znajomością metodologii badań molekularnych, a także w sposób wskazujący na doskonałą znajomość zagadnienia używa technik bioinformatycznych do subtypowania HIV-1, wyznaczania dystansu genetycznego, wskaźników ewolucji (*mutacje ds i dn*), a także przewidywania kodonów aminokwasowych w analizowanych pętlach *env*. Również dobór testów statystycznych do analiz podstawowych jest prawidłowy.

Wyniki zawierają 12 tabel i 6 rycin i są przedstawione bardzo przejrzysto z uwzględnieniem właściwych danych statystycznych. Analiza hipermutacji i analizy podstawowe są przeprowadzone bez zastrzeżeń. Drobną uwagę stylistyczną dotyczy określenia wariantu genetycznego - używane jest słowo "podtyp", właściwszym wydawałoby się "subtyp" w przypadkach gdy mamy do czynienia z nierekombinowanym subtypem zdefiniowanym

zgodnie z *HIV sequence compendium*. Wszystkie warianty są ostatecznie określone prawidłowo na podstawie filogenezy (96.88% subtyp B, 3.13% subtyp A1). Doktorant szczegółowo i przy użyciu szerokiego wachlarza narzędzi bioinformatycznych określa i porównuje przewidywany tropizm HIV-1. Użycie reguły 11/25, obliczeń ładunku pętli V3, PSSM jest prawidłowe. Jeśli chodzi o użycie geno2pheno doktorant określił próg odcięcia na 20%, co jest właściwe dla oznaczeń wykonywanych pojedynczo i zgodne z metodologią pracy doktorskiej; takie ustawienie progu spowodowało wysoką liczbą kwalifikacji sekwencji jako X4 i zmniejszyło korelację pomiędzy badanymi metodami. Z ciekawości recenzenta rodzi się jednakże pytanie jaka byłaby zgodność między metodami przy użyciu progu 10% (używanego dla oznaczeń w tryplikatach) oraz 5.75% (używanego w badaniu MOTIVATE). Taka analiza byłaby uzupełnieniem ocenianej, już wartościowej, pracy doktorskiej. Analiza klastrow jest prawidłowa, choć w drzewie prezentowanym na rycinie 18 nie są dobrze widoczne wartości bootstrap dla zidentyfikowanych klastrow, prezentacja tego drzewa jako drzewa prostokątnego zamiast gwiazdzistego mogłaby poprawić przejrzystość ryciny. Czy skupisko oznaczone na czerwono na tej rycinie spełnia kryteria przypisania do wspólnego klastra? Analizy zmienności aminokwasowej gp120 pomiędzy grupą wczesnie i przewlekle zakażoną są kolejnym nowatorskim aspektem ocenianej pracy doktorskiej.

Dyskusja jest obszerna i przejrzysta. Autor skrupulatnie odnosi uzyskane wyniki do piśmiennictwa, wskazując na ich kontekst w porównaniu do opublikowanych już danych. Oceniany regionalizm występowania wariantów A1 można jeszcze odnieść do danych wschodnioeuropejskich gdzie ten wariant występuje częściej. Różnice aminokwasowe w gp120 zostały prawidłowo porównane do danych z piśmiennictwa i pozostają istotnym wynikiem pracy. Autor prawidłowo porównuje i opisuje ograniczenia narzędzi bioinformatycznych stosowanych do oznaczeń tropizmu HIV-1. Dyskusję zwięźcza wartościowy podrozdział "obserwacje" będący krótkim podsumowaniem wyników w kontekście piśmiennictwa.

Wnioski wynikają z wyników i przeprowadzonej dyskusji. Należy zauważyć, że wniosek pierwszy ma już swoje odzwierciedlenie w polskich wytycznych - rekomendacje Polskiego Towarzystwa Naukowego AIDS zalecają opcjonalne oznaczanie tropizmu u pacjentów przed wdrożeniem leczenia antyretrowirusowego.

Piśmiennictwo jest obszerne, prawidłowo dobrane, zawiera 188 pozycji głównie obcojęzycznych, aktualnych, potwierdza biegłość autora w analizie danych i odnoszenie ich

do piśmiennictwa. Struktura piśmiennictwa potwierdza dogłębne przygotowanie teoretyczne pracy doktorskiej.

Podsumowując, recenzent zwraca uwagę na następujące zagadnienia i uprzejmie prosi o dyskusję na następujące pytania:

1. Z czego wynika użycie prowirusowego DNA (a nie wirusowego RNA) jako podstawy do przewidywania tropizmu?
2. Jaka jest częstość występowania wariantów X4 przy ustawieniu progu FPR na poziomie 10% i 5.57%? Czy po takim ustawieniu progu zgodność pomiędzy analizowanymi narzędziami bioinformatycznymi będzie wyższa?
3. Czy istnieje możliwość powtórnego oznaczania tropizmu HIV-1 u osób z zakażeniem wczesnym po przejściu w fazę przewlekłą? Analiza taka byłaby niezmiernie ciekawa w kontekście zmiany tropizmu.

Pragnę podkreślić, że powyższe zagadnienia do dyskusji stanowią rozszerzenie pracy, której wartość merytoryczną oceniam bardzo wysoko.

Metodologicznie praca jest napisana bardzo poprawnie, analizy sekwencyjne i bioinformatyczne są szczegółowe, problematyka nowatorska oraz odzwierciedlające nowoczesne trendy w wirusologii molekularnej HIV-1. Nie ma zastrzeżeń językowych, stylistycznych i interpunkcyjnych. Praca doktorska mgr Piotra Kruszyńskiego "*Analiza zmienności w obrębie genu env szczepów ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1 występujących na terenie Polski*", jest pracą o wysokiej wartości naukowej i praktycznej. Potwierdza dogłębną znajomość doktoranta na temat analizowanych zagadnień, dlatego z wnioskiem i zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Wydziału Farmaceutycznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie mgr Piotra Kruszyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z przyjemnością pozwalam sobie również wnioskować o wyróżnienie pracy doktorskiej (o ile przed obroną pracy zostanie spełnione kryterium publikacyjne).

Z poważaniem

Prof. dr hab. n. med.

Miłosz Parczewski

KIEROWNIK
Kliniki Chorób Zakaźnych, Tropikalnych
i Nabytych Niedoborów Immunologicznych
prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski