

Dziekanat MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 1.04.2016
L.dz. nr 10/2016



Prof. dr hab. Jerzy Rola
Zakład Wirusologii
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Krzysztofa Łepka pt. „Diagnostyka szczepów wirusa grypy przy użyciu nowych metod molekularnych”

wykonanej w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Bogusław Szewczyk, a promotorem pomocniczym dr Łukasz Rąbalski.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Dziekana Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 8 lutego 2016 r. (L. dz. MWB/12/2016), powołujące się na uchwałę Rady z dnia 13 listopada 2015 r.

Grypa jest ostrą chorobą zakaźną ludzi i wielu gatunków zwierząt, wywoływana przez trzy różne typy antygenowe wirusa grypy, z których najważniejszy jest typ A. Ze względu na istotne znaczenie epidemiologiczne i ekonomiczne choroba ta stanowi ciągle przedmiot dużego zainteresowania nauki i praktyki lekarsko-weterynaryjnej. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) co roku na grypę i choroby grypopodobne choruje od 330 mln do 1.5 mld ludzi, a umiera od 500 tys. do miliona osób. W epidemiologii grypy, oprócz dzikich ptaków wodnych, które stanowią naturalny rezerwuar wirusów grypy, ważną rolę odgrywają także świnie. Zwierzęta te pełnią funkcję „biologicznego miksera”, w którym może dochodzić do mieszania się szczepów ludzkich, ptasich i świńskich, a w konsekwencji do powstawania nowych podtypów wirusa grypy, często o potencjale pandemicznym.

W diagnostyce laboratoryjnej grypy stosowane są różne metody badawcze, począwszy od złotego standardu jakim jest izolacja wirusa na zarodkach kurzych, przez metody

serologiczne, po najnowocześniejsze metody oparte na technikach biologii molekularnej. Prawidłowa i szybka identyfikacja wirusa grypy ma priorytetowe znaczenie przy wyborze właściwego postępowania leczniczego. Jednakże większość metod stosowanych w rutynowej diagnostyce grypy jest nieskuteczna w wykrywaniu infekcji mieszanych. Z tego też względu wybór tematu pracy doktorskiej mgr Krzysztofa Łepka, polegający na opracowaniu nowej metody wykrywania i różnicowania wirusów grypy, opierającej się na polimorfizmie konformacyjnym pojedynczych nici DNA w zmiennej temperaturze (MSSCP) należy uznać za bardzo trafny i interesujący zarówno z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska różni się od powszechnie przyjętego modelu opartego na szczegółowym opisie doświadczenia, uwzględniającym standardowe rozdziały oraz dokumentację otrzymanych wyników. Zamiast tej formy Doktorant przedstawił, jako podstawę ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora, dzieło stanowiące spójny tematycznie cykl publikacji wieloautorskich złożony z pracy przeglądowej i oryginalnych prac doświadczalnych, opublikowanych w latach 2011-2015 w krajowym i zagranicznych czasopismach anglojęzycznych znajdujących się w bazie JCR. W skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

I. Praca przeglądowa:

1. Beata Pajak and Krzysztof Lepek: Native nucleic acid electrophoresis as an efficient alternative for genotyping method of influenza virus. *Acta Biochimica Polonica* 2014, 61, 479-483. (IF=1,153; MNiSW=15)

II. Prace oryginalne:

1. Beata Pajak, Ilona Stefanska, Krzysztof Lepek, Stefan Donevski, Magdalena Romanowska, Magdalena Szeliga, Lidia B. Brydak, Boguslaw Szewczyk, and Krzysztof Kucharczyk: Rapid Differentiation of Mixed Influenza A/H1N1 Virus Infections with Seasonal and Pandemic Variants by Multitemperature Single-Stranded Conformational Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2011, 49, 2216–2221. (IF=4,153; MNiSW=32)
2. Krzysztof Łepka, Beata Pajak, Paweł Siedlecki, Marcin Niemcewicz, Janusz Kocik, Ho-Sheng Wu, Ji-Rong Yang, Krzysztof Kucharczyk, and Bogusław Szewczyk: Genetic diversity of hemagglutinin gene of A(H1N1)pdm09 influenza strains isolated in Taiwan and its potential impact on HA-neutralizing epitope interaction. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2014, 10, 577–585. (IF=2,366; MNiSW=25)

3. Krzysztof Lepek, Beata Pajak, Lukasz Rabalski, Kinga Urbaniak, Krzysztof Kucharczyk, Iwona Markowska-Daniel, and Boguslaw Szewczyk: Analysis of Coinfections with A/H1N1 Strain Variants among Pigs in Poland by Multitemperature Single-Strand Conformational Polymorphism. *BioMed Research International* 2015, Article ID 535908. (IF=1,579; MNiSW=20)

Celem pracy było opracowanie nowej metody wykrywania, różnicowania i charakteryzowania szczepów wirusa grypy, wykorzystującej różnice w sekwencji nukleotydowej poszczególnych genów. Sumaryczny współczynnik wpływu wyliczony dla prac stanowiących cykl publikacji wynosi IF=9.251, natomiast łączna liczba punktów według wykazu czasopism Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego to 92. Przedstawione wskaźniki bibliometryczne świadczą o wysokiej randze czasopism, w których Doktorant opublikował wyniki badań, są one także potwierdzeniem wysokiego poziomu naukowego przeprowadzonych badań. Wszystkie prace są opracowaniami wieloautorskimi, w dwóch publikacjach Doktorant jest pierwszym, a w dwóch kolejnych drugim i trzecim autorem.

Opracowanie zawierające wyżej wymieniony cykl publikacji liczy łącznie 124 strony. W części opisowej rozprawy doktorskiej, która stanowi uzupełnienie cyklu publikacji Doktorant zawarł wprowadzenie oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Wprowadzenie rozpoczyna się od opisu ortomyksowirusów oraz podziału taksonomicznego rodziny *Orthomyxoviridae*. W podrozdziale tym Autor wyjaśnił także sposób tworzenia nazewnictwa wirusów grypy, z zaznaczeniem różnic w nazewnictwie izolatów pochodzących od człowieka i zwierząt. Dalej znajduje się opis budowy morfologicznej, organizacji genomu, budowy i funkcji białek wirusowych oraz cyklu życiowego wirusa grypy typu A. Dużą część wprowadzenia zajmuje wyjaśnienie molekularnego podłoża patogenyzy zakażenia wirusami grypy, zwłaszcza sposobu wiązania się szczepów ludzkich i ptasich z receptorami komórek gospodarza i jego wpływ na dalsze rozprzestrzenianie się wirusów wśród ludzi i zwierząt. Kolejnym zagadnieniem szczegółowo omawianym jest zmienność wirusa grypy z uwzględnieniem zjawisk przesunięcia antygenowego i skoku antygenowego. Istotę zmienności wirusa i zagrożeń z tego wynikających doskonale obrazuje zamieszczony opis okoliczności pojawienia się w Meksyku w 2009 r. nowego pandemicznego szczepu wirusa grypy A/H1N1, który w krótkim czasie rozprzestrzenił się na cały świat powodując zachorowania i śmierć wśród ludzi oraz w populacji świń. Część opisową kończy podrozdział dotyczący profilaktyki, zwalczania i diagnostyki zakażeń wirusem grypy. Doktorant charakteryzuje sposób działania ogólnoswiatowego systemu nadzoru i reagowania na infekcje

wirusem grypy, którego koordynatorem jest WHO, aktualnie stosowane i będące w fazie opracowywania lub badań klinicznych szczepionki i leki przeciwwirusowe oraz metody diagnostyki laboratoryjnej. Części opisowej rozprawy towarzyszą ryciny, które ułatwiają czytającemu śledzenie i zrozumienie opisywanych zagadnień.

Podsumowując część opisową rozprawy doktorskiej stwierdzam, że jest to ciekawe opracowanie, napisane starannie co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktoranta oraz o znajomości aktualnego piśmiennictwa z tego zakresu.

Uwagi do tej części rozprawy:

- str. 6 – przebudowy wymaga zdanie: „Pojawienie się w roku 2009 nowego szczepu wirusa grypy typu A zapoczątkowało trwającą ponad dwa lata pandemię, która tylko w pierwszym roku była powodem ponad 60 milionów zachorowań w samych Stanach Zjednoczonych Ameryki”. Pandemia nie powoduje zachorowań, wywołuje je wirus o właściwościach pandemicznych, podczas pandemii można odnotować/stwierdzić określoną liczbę zachorowań
- str. 7 – w zdaniu „Większość technik stosowanych w rutynowej diagnostyce...” dodać „grypy”
- str. 9 – zmienić „farm” na „ferm”
- str. 15 - zmienić „wykres” na „rycina”
- str. 35 – jest „ w górnych drogach pokarmowych” powinno być „w górnych drogach oddechowych”
- str. 36 – jest „okres inkubacji wirusa..” powinno być „okres inkubacji choroby”
- str. 40 – zmienić „powyższe wydarzenia” na „powyższe przykłady”

Przedstawione uwagi nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy i nie mają wpływu na jej pozytywną i bardzo wysoką ocenę.

Analizując przedstawiony przez Doktoranta spójny tematycznie cykl publikacji stwierdzam, że dodatkowa ocena przez recenzenta zamieszczonych prac wydaje się zbędna. Każda z tych prac przed opublikowaniem została szczegółowo sprawdzona i oceniona pod względem wymagań formalnych stawianych pracom doświadczalnym lub przeglądowym, przez redakcje poszczególnych czasopism. Dodatkowo poddano je ocenie merytorycznej przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, którzy najczęściej są uznanymi autorytetami w danej dziedzinie wiedzy. Opublikowanie pracy w danym czasopiśmie oznacza, że przeszła ona z pozytywnym wynikiem każdy z tych etapów. W przypadku

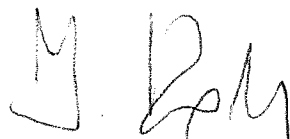
rozprawy doktorskiej mającej postać cyklu publikacji wieloautorskich zadaniem recenzenta, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r., jest ocena indywidualnego wkładu kandydata do stopnia naukowego doktora w powstanie pracy zbiorowej. Zgodnie z przyjętymi zasadami wkład ten powinien być znaczący. Z uwagi na zbiorowy charakter zamieszczonych publikacji integralną częścią dokumentacji jaką przedstawił Doktorant do oceny są oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z autorów w powstanie poszczególnych prac. Analizując załączone oświadczenia stwierdziłem, że udział Doktoranta był faktycznie dominujący i polegał na opracowaniu koncepcji prac, zaplanowaniu i prowadzeniu badań, opracowaniu i interpretacji wyników, zbieraniu piśmiennictwa, pisaniu manuskryptu i dokonywaniu korekty po otrzymaniu recenzji. Udział promotora polegał na konsultacjach i opiece naukowej, korekcie prac przed złożeniem do druku oraz zdobywaniu środków finansowych, a promotora pomocniczego na prowadzeniu badań oraz interpretacji wyników i wyciąganiu wniosków. Biorąc pod uwagę zamieszczone oświadczenia współautorów, w opinii recenzenta Doktorant jest uprawniony do przedstawienia prezentowanego cyklu publikacji jako podstawy ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

Podsumowując drugą część rozprawy doktorskiej zawierającą cykl publikacji stwierdzam, że Doktorant opracował nową metodę diagnostyczną opartą na technice MSSCP, a następnie wykazał jej przydatność w praktyce wykrywając i różnicując zakażenia szczepami sezonowymi i pandemicznym wirusa grypy typu A u pacjentów z Polski. Analogiczne badania przeprowadzone na modelu świni domowej wykazały użyteczność metody do wykrywania mieszanych zakażeń wirusem grypy i do różnicowania wariantów wirusa krążących w populacji świń. Udowodnił także, że metoda ta może być z powodzeniem wykorzystywana również do analizy zmienności genetycznej wybranych rejonów genomu wirusa grypy.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona rozprawa doktorska stanowiąca spójny tematycznie cykl 4 publikacji pod wspólnym tytułem „Diagnostyka szczepów wirusa grypy przy użyciu nowych metod molekularnych”, w pełni odpowiada warunkom określonym w artyku 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) oraz zapisom Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. 2011, Nr 204, poz. 1200) i przedstawiam Radzie Międzyuczelnianego Wydziału

Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Krzysztofa Łepka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na aktualność problematyki badawczej ujętej w recenzowanej rozprawie doktorskiej, opracowanie nowej metody badawczej oraz uzyskanie wartościowych wyników badań wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Jerzy Rola

Puławy, 29.03.2016 r.