



Białystok 29 czerwca 2015 r.

Dr hab. med. Jerzy Jaroszewicz
Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Dziękuję MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia 06.07.2015v.
L.dz. nr 23/2015

Flu

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr. Magdy Rybickiej
pt. „Analiza wpływu polimorfizmu genetycznego
wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) na przebieg terapii przeciwwirusowej”

wykonanej pod kierunkiem: prof. dr hab. Krzysztofa Piotra Bielawskiego (promotor) oraz
dr n. med. Piotra Stalke (promotor pomocniczy)

Przewlekłe zakażenie HBV jest jedną z wiodących chorób zakaźnych na świecie. Światowa Organizacja Zdrowia szacuje, że z około 2 miliardów ludzi, którzy przebyli zakażenie HBV ponad 240 milionów wykazuje aktywną replikację tego wirusa. Wśród istotnych cech HBV podkreśla się jego zdolność do wytwarzania stabilnych, odpornych na leczenie form replikacyjnych w zakażonych komórkach (cccDNA), zdolność do integracji genomu HBV z genomem gospodarza, lecz także dużą zmienność genetyczną wynikającą z braku zdolności do korekcji błędów polimerazy DNA HBV. Zmienność genetyczna wirusa warunkuje m.in. progresję choroby, występowanie serokonwersji w układach antygenów HBe oraz HBs w przebiegu naturalnym zakażenia, czy też odpowiedź na leczenie interferonem. Doktorantka podjęła w swojej rozprawie doktorskiej ambitną i złożoną tematykę oceny wpływu zmienności genetycznej HBV na odpowiedź na leczenie inhibitorami polimerazy HBV przy użyciu innowacyjnych metod biologii molekularnej.

Przedstawiona rozprawa doktorska składa się z Wprowadzenia oraz cyklu 4 prac – jednej poglądowej oraz trzech oryginalnych (umieszczonych na Liście Filadelfijskiej), będących spójnym tematycznie opracowaniem dotyczącym metodyki oznaczania polimorfizmu HBV w zakresie genu polimerazy HBV oraz jego wpływu na prowadzone leczenie przeciwwirusowe. W dość krótkim wprowadzeniu Doktorantka przedstawia najistotniejsze fakty dotyczące cyklu replikacyjnego, zmienności genetycznej wirusa, formułuje cele oraz metody i syntetycznie opisuje kolejne etapy ich realizacji. Wprowadzenie jest napisane starannie, szczegółowo i przystępnie. Wśród drobnych uwag Doktorantka ilustrując potencjał replikacyjny HBV oraz liczbę nowych mutacji powstających na dobę oparła się na uroszczonym założeniu replikacji HBV na poziomie 10^8 - 10^{10} kopii wirusa na milimetr co jest wartością wysoką. Zdecydowana większość chorych przewlekłe zakażonych HBV wykazuje nasilenie replikacji na znacznie niższym poziomie. Założenie to jest jednak jedynie informacyjne i nie ma wpływu na wyniki uzyskane w rozprawie doktorskiej. Na

szczególne podkreślenie zasługuje obszerna praca pogładowa wchodząca w skład niniejszej rozprawy, a opublikowana w czasopiśmie *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. Jest to cenne opracowanie dotyczące budowy wirionu oraz genomu HBV, mechanizmów regulujących zmienność genetyczną wirusa oraz znaczenia klinicznego mutacji HBV w poszczególnych regionach genomu (genów *env*, *core*, *pol*, *X*). Jest to jedno z najbardziej szczegółowych dostępnych w polskim piśmiennictwie opracowanie tego zagadnienia.

Cele rozprawy doktorskiej są postawione precyzyjnie i mają istotne znaczenie dla praktyki klinicznej. Pierwszym celem było opracowanie metod detekcji materiału genetycznego HBV od chorych z niską replikacją wirusa oraz optymalizacji czułości metody. Drugim celem zaś było zastosowanie tych metod do oceny wpływu polimorfizmu HBV na przebieg terapii inhibitorami polimerazy HBV. Obydwa te cele zostały zrealizowane prawidłowo. Wyniki prac zostały przedstawione w trzech pracach oryginalnych, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, opublikowanych w renomowanych czasopismach anglojęzycznych w 2014 roku. Sumaryczna punktacja IF tych prac wynosi 9,419.

W pierwszej z tych prac opublikowanej w *Journal of Clinical Microbiology* Doktorantka przedstawia zastosowanie dwóch innowacyjnych metod w analizie oporności na inhibitory polimerazy HBV, a mianowicie wielotemperaturowego polimorfizmu jednoniciowych konformacji DNA (MSSCP) oraz spektrometrii mas za pomocą laserowej desorpcji i jonizacji próbki wspomaganej matrycą (MALDI-TOF MS). Techniki te zostały zastosowane w analizie mutacji polimerazy HBV 45 chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B (PZW-B) pozostających pod opieką Kliniki Chorób Zakaźnych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. U 17 z nich analizowano próbki krwi przed wdrożeniem leczenia inhibitorami polimerazy HBV, zaś 28 było już uprzednio leczonych. Do porównania wyników zastosowano rutynowo stosowany zestaw INNOLiPA oraz bezpośrednie sekwencjonowanie (Genomed, Warszawa). Wśród najważniejszych wyników należy podkreślić, że obydwie z zastosowanych technik MSSCP oraz MALDI-TOF MS okazały się bardziej czułe niż test INNOLiPA. Co więcej, za pomocą MALDI-TOF można było stwierdzić obecność wariantów opornych już przy częstości ich występowania na poziomie 1%, a także przy niskiej replikacji wirusa > 17 IU/mL HBV-DNA. Wyniki te otwierają nowe możliwości testowania występowania wariantów opornych na leczenie inhibitorami polimerazy HBV u chorych z niską replikacją, co dotychczas było niewykonalne przy użyciu technik stosowanych rutynowo.

W kolejnej pracy opublikowanej w *Medical Science Monitor* wdrożono wyżej opisane techniki (MSSCP oraz MALDI-TOF MS) do oceny częstości występowania wariantów opornych na leczenie u 54 chorych z PZW-B otrzymujących leczenie przeciwwirusowe lamiwudyną (55%), entekawirem (30%), tenofowirem (13%) oraz skojarzone lamiwudyną z adefowirem (2%). Co więcej, oceniono wpływ występowania oporności oznaczonej przy użyciu tych ultra-czułych metod przed rozpoczęciem leczenia na jego skuteczność. W pracy tej za pomocą MALDI-TOF MS stwierdzono występowanie wariantów opornych na leczenie AN u 74% chorych dotychczas nieleczonych i 93% uprzednio leczonych. Dokładna analiza statystyczna wykazała, że obecność wariantów opornych przed rozpoczęciem leczenia nie wiązała się z odpowiedzią na to leczenie, co jest zgodne z danymi literaturowymi. Wśród czynników wpływających na odpowiedź na leczenie wyodrębniono płeć żeńską, młodszy wiek oraz niższe wyjściowe HBV-DNA. Jest to bardzo cenne polskie opracowanie dotyczące

potencjalnych czynników prognostycznych odpowiedzi na leczenie inhibitorami polimerazy. Wśród drobnych uwag pozostaje przeprowadzenie analizy wieloczynnikowej, do której włączono również parametr który nie uzyskał istotności w analizie jednoczynnikowej (stan kompetencji immunologicznej), zwykle zaś modele wieloczynnikowe opiera się parametrach istotnych bądź zbliżonych do istotnych z analizy jednoczynnikowej. Z drugiej strony na podkreślenie zasługuje fakt zastosowania kolejnej metody z zakresu biologii molekularnej – analizy polimorfizmu IL-10, który jest cennym predyktorem w przebiegu naturalnych zakażenia HBV.

W trzeciej z prac oryginalnych, opublikowanej ponownie w *Journal of Clinical Microbiology* Doktorantka analizuje ewolucje powstawania wariantów opornych HBV w trakcie leczenia przeciwwirusowego analogami nukleoz(t)ydowymi. Jest to moim zdaniem praca najcenniejsza, będąca jednym z pierwszych tego typu opracowań w piśmiennictwie. W pracy tej użyto techniki MALDI-TOF MS do oceny nie tylko jakościowej lecz również ilościowej występowania wariantów opornych na leczenie przed i w trakcie stosowania terapii u 43 chorych z PZW-B. Stwierdzono, że już w 12 tygodniu leczenia nasilenie wariantów opornych na analogi nukleozyd(t)owe istotnie zwiększa się u chorych, u których leczenie to jest nieskuteczne w przeciwieństwie do chorych z dobrą odpowiedzią na leczenie. Praca ta podkreśla istotny fakt, że nie tyle stwierdzenie obecności wariantów, ale ich udział procentowy może być istotnym czynnikiem prognostycznym odpowiedzi na leczenie. Wynik jest niezmiernie ciekawy oraz istotny z klinicznego punktu leczenia. Wskazuje on na potencjalną przydatność techniki MALDI-TOF MS w rutynowej praktyce klinicznej w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie już po 12 tygodniach od jego rozpoczęcia.

Mgr Magda Rybicka w podsumowaniu swojej rozprawy doktorskiej sformułowała prawidłowe wnioski, które są uzasadnione przeprowadzonymi analizami. Doktorantka szczegółowo zbadała ewolucje występowania wariantów lekoopornych w trakcie leczenia analogami nukleozyd(t)owymi co jest osiągnięciem cennym i nowatorskim. Co więcej, wskazuje ona na potencjalną przydatność nowych technik w ocenie zawartości procentowej wariantów lekoopornych jako wczesnego wskaźnika oporności oraz użytecznego narzędzia diagnostycznego. Jest to wniosek ze wszech miar uzasadniony na podstawie uzyskanych wyników. Aby jednak uwiarygodnić jego przydatność w rutynowej praktyce klinicznej, należałoby się również ustosunkować do efektywności kosztów zastosowania tych metod, jak też porównać ich czasochłonność z metodami stosowanymi rutynowo.

Podsumowując przedstawioną do oceny rozprawę doktorską magister Magdy Rybickiej pt. „Analiza wpływu polimorfizmu genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) na przebieg terapii przeciwwirusowej” uważam za niezwykle ciekawą, wartościową oraz ważną z klinicznego punktu widzenia. Spełnia ona warunki zawarte w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 22 września 2011 r. (Dz. U. Nr 204) stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr. Magdy Rybickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

dr hab.n.med. Jerzy Jaroszewicz
specjalista chorób zakaźnych
2192248

Jerzy Jaroszewicz