



Dr hab. Marcin Nowotny

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

Dziekanat MWB UG i GUMed

Wpłynęło dnia 22.06.2015r.

L.dz. nr 27/2015

Przele

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

Wirusowe zapalenie wątroby typu B, mimo istnienia skutecznej szczepionki, nadal pozostaje palącym problemem zdrowotnym na całym świecie. Jest ono wywoływane przez wirusa HBV (hepatitis B virus). Chroniczne zakażenie tym wirusem wykryto u ponad 350 milionów pacjentów. Infekcja prowadzi do stanu zapalnego oraz nowotworów wątroby. Stosunkowo niedawno opracowano metody leczenia zapalenia wątroby typu B, które w dużym stopniu opierają się o leki początkowo opracowane do leczenia zespołu nabytego braku odporności (AIDS) wywołwanego przez wirus HIV. Są to analogi nukleotydowe i nukleozydowe, które hamują odwrotne transkryptazy z HBV i HIV. Całkowite wyeliminowanie infekcji HBV nie jest jednak możliwe, materiał genetyczny wirusa w postaci cccDNA pozostaje w hepatocytach po zastosowaniu terapii.

W skład przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej wchodzi krótki wstęp teoretyczny w języku polskim oraz angielskim oraz cztery prace naukowe. Jedna z nich to praca przeglądowa w języku polskim, a trzy to prace doświadczalne w języku angielskim. Głównym tematem tych prac jest niezwykle ważne zagadnienie genetycznej różnorodności wirusa HBV. Ze względu na niską wierność odwrotnej transkryptazy HBV, podczas replikacji materiału genetycznego wirusa wprowadzane są liczne mutacje. Niektóre z nich są selekcyonowane in vivo, co może prowadzić na przykład do lekooporności lub unikania przez



wirusa odpowiedzi immunologicznej pacjenta. Szczególnie istotne są mutacje występujące w odwrotnej transkryptazie, które powodują oporność na stosowane w leczeniu inhibitory tego enzymu. Dlatego analiza występujących u danego chorego wariantów HBV może mieć kluczowe znaczenie w prowadzeniu efektywnej terapii.

Artykuł przeglądowy (Publikacja 1) w języku polskim został opublikowany w Postępkach Higieny Doświadczalnej i Klinicznej. Jest on dobrym wstępem teoretycznym do opisanych w pozostałych artykułach wyników prac doświadczalnych. W Publikacji 1 w sposób klarowny opisano budowę i cykl replikacji HBV. Wyczerpująco przedstawiono zagadnienie opisanych u pacjentów mutacji poszczególnych genów HBV. Według deklaracji doktorantki brała ona udział we wszystkich kluczowych etapach przygotowania tego artykułu.

Pierwsza z zawartych w rozprawie prac doświadczalnych (Publikacja 2) została opublikowana w roku 2014 w dobrym czasopiśmie Journal of Clinical Microbiology. Jej głównym celem była opracowanie nowych metod wykrywania rzadkich wariantów genetycznych odwrotnej transkryptazy HBV w próbkach krwi pacjentów. Przetestowano dwie metody. Pierwsza z nich, Multitemperature Single Strand Conformation Polymorphism (MSSCP) wykorzystuje różnice w migracji fragmentów DNA o różnej sekwencji w żelu poliakrylamidowym. Druga opiera się o spektrometrię mas (MALDI-TOF). W przypadku pierwszej metody możliwe było wykrycie wariantów, które stanowią zaledwie 2% populacji wirusa. Druga metoda dała jeszcze wyższą czułość na poziomie 1% populacji. Są to znacznie wyższe czułości niż w przypadku obecnie stosowanych komercyjnych metod oznaczania lekooporności HBV. Wysoko oceniam wyniki zaprezentowane w tej pracy, została ona już oceniona pozytywnie przez recenzentów tego artykułu. Mgr Rybicka jest wiodącym autorem

tej pracy, brała udział w planowaniu metodyki, przeprowadziła badania i ich analizę statystyczną, brała udział w pisaniu pracy. Podczas obrony chciałbym prosić doktorantkę o przedyskutowanie jakie są szanse zastosowania metod MSSCP oraz MALDI-TOF w praktyce klinicznej.

Celem badań opisanych w Publikacji 3 opublikowanej w roku 2014 w Medical Science Monitor była ocena efektywności terapii WZW typu B, mierzonego zanikiem DNA wirusa, w zależności od parametrów infekcji i stanu zapalnego oraz obecności lekoopornych wariantów HBV. W badaniach tych wykorzystano między innymi metody wykrywania mutacji opisane w Publikacji 2. Nieco zaskakujące jest to, że skuteczność terapii nie zależała od obecności lekoopornych wariantów wirusa na przed podaniem leków. Znacznie silniejszą korelację z sukcesem terapii miały płeć i wiek pacjenta oraz początkowa liczba cząsteczek wirusa we krwi. Nie wykazano natomiast związku między skutecznością terapii a polimorfizmami w promotorze IL-10, cytokiny, która reguluje odpowiedź zapalną. Cennym praktycznym wkładem zawartych w rozprawie prac jest to, że wyniki te mogą mieć wpływ na rekomendacje NFZ dotyczące leczenia pacjentów z WZW typu B w Polsce, w tym w szczególności w kwalifikowaniu do terapii przeciwwirusowej. Mgr Rybicka jest dzielonym pierwszym autorem tej pracy. Brała udział planowaniu badań, ich przeprowadzeniu, analizie wyników i ich interpretacji, a także w pisaniu pracy.

Kolejna praca ukazała się w roku 2015 w dobrym czasopiśmie z dziedziny chorób zakaźnych Clinical Microbiology and Infection. Jest ona w pewnym sensie rozszerzeniem Publikacji 4. Zastosowano w niej metodę MALDI-TOF do zbadania występowania mutacji lekoopornych HBV przed oraz w trakcie terapii lekami przeciwwirusowymi oraz wpływem ich



obecności na efektywność leczenia. Pojawienie się wariantów lekoopornych w tygodniach 12 i 48 leczenia korelowało z nieskutecznością terapii. Warto podkreślić, że mgr Rybicka jest pierwszym, a także dzielonym korespondującym autorem tej pracy i brała udział w przygotowaniu koncepcji badania. Dodatkowo doktorantka planowała metodykę badań, przeprowadziła badania i analizę statystyczną wyników, a także brała udział w pisaniu pracy. Podczas lektury tej pracy nasunęło mi się pytanie o mutację N236T, która często występuje w badanych próbkach. Czy dostępne są informacje o roli tej mutacji i molekularnym/strukturalnym mechanizmie lekooporności wariantu N236T? Dodatkowo chciałbym prosić o wyjaśnienie z czego może wynikać różnica w konkluzjach Publikacji 3 i 4. W pierwszej z nich obecność lekoopornych wariantów wirusa przed leczeniem nie wpływała na skuteczność terapii, podczas, gdy wyniki w Publikacji 4, wskazują, że 15-procentowy lub wyższy udział lekoopornych wariantów przed terapią decyduje o jej nieskuteczności.

Podsumowując, przedstawiona seria prac dotyczy ważnego problemu zdrowotnego i może mieć konkretne przełożenie na planowanie i monitorowanie terapii infekcji HBV. Uważam, że rozprawa spełnia warunki określone ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i z pełnym przekonaniem stawiam wniosek o dopuszczenie pani mgr Magdy Rybickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy, bardzo istotne pole badań oraz sukces publikacyjny wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą

Marcin Nowotny

2015.06.16