

## Ocena

### rozprawy na stopień doktora nauk medycznych zatytułowanej: „Wybrane markery molekularne zakażeń wrodzonych wirusem cytomegalii: rola polimorfizmu genów kodujących kompleks gCIII wirusa i ekspresja receptorów RIG I – podobnych”

autorstwa

**mgr Agnieszki Jabłońskiej**

Badania będące przedmiotem pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszka Jabłońska wykonała w Pracowni Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk. Przedstawiona rozprawa napisana została w układzie charakterystycznym dla prac doświadczalnych i składają się na nią następujące rozdziały: Wstęp, Cele Pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski. Do pracy dołączono Wykaz Skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Spis Tabel i Rycin oraz Spis Piśmiennictwa obejmujący 376 pozycji. Łącznie 161 stron maszynopisu, 21 tabel i 25 rycin.

Od lat czterdziestych ubiegłego wieku znane są konsekwencje zakażeń wirusowych, które mają miejsce w trakcie trwania ciąży, względnie w okresie okołoporodowym. Pierwszym wirusem, którego działanie teratogenne zostało potwierdzone, był wirus różyczki. W latach 1964 – 1965 w Stanach Zjednoczonych zakażenia wirusem różyczki były przyczyną powstania wad wrodzonych u ponad 20 000 noworodków. Opracowanie i wprowadzenie w 1969 roku szczepionki przeciwko różyczce zaowocowało sukcesem i sprawiło, że brak jest przypadków różyczki wrodzonej w krajach stosujących szczepienia lub należą one do rzadkości.

Niestety, cały czas aktualnym problemem, sprawiającym poważne zagrożenia zarówno dla przebiegu ciąży, jak i płodu, są wirusy z rodziny *Herpesviridae* takie jak *Herpes simplex typu 1 i typu 2* (HSV-1, HSV-2), *ospa wietrznej i półpaśca* (VZV), a przede

wszystkim *wirus cytomegalii* (hCMV). Cechą charakterystyczną wirusów należących do tej rodziny jest zdolność wywoływania zakażeń latentnych. Polega ona na tym, że w wyniku pierwotnego zakażenia wirus nie zostaje całkowicie wyeliminowany z organizmu, lecz jego materiał genetyczny umiejscawia się w komórkach i pozostaje w nich w stanie spoczynku. Dla wirusa Herpes simplex typu -1 i typu -2 oraz dla wirusa ospy wietrznej i półpaśca są to komórki układu nerwowego natomiast dla pozostałych herpeswirusów, w tym dla *wirusa cytomegali*, docelowym miejscem latencji są komórki układu immunologicznego. Z uwagi na znaczenie herpeswirusów dla patogenezy chorób człowieka, od kilkudziesięciu lat prowadzone są prace, których celem jest uzyskanie skutecznej szczepionki. Do tej pory udało się opracować i wdrożyć jedynie szczepionkę przeciwko VZV. Szczepionka ta przeciwdziała zachorowaniu, względnie bardzo osłabia objawy ospy wietrznej i tym samym ogranicza możliwość wytworzenia zakażenia latentnego, ale nie w 100%. Jest to duże osiągnięcie i mimo, że w naszym kalendarzu szczepień należy jedynie do szczepionek zalecanych, powinna być stosowana na szeroką skalę. Brak odporności kobiet w wieku rozrodczym na zakażenie tak teratogennym wirusem jakim jest VZV stanowi ogromne zagrożenie dla prawidłowego przebiegu ciąży i urodzenia zdrowego dziecka.

Dużo gorzej sytuacja przedstawia się w przypadku zakażeń hCMV. Trudność w otrzymaniu skutecznej szczepionki polega na tym, że powinna chronić zarówno przed pierwotnym zakażeniem i tym samym zapobiegać latencji ale również, ze względu na znaczną zmienność hCMV, przed nadkażeniami innymi szczepami wirusa. Brak możliwości stosowania skutecznej immunoprofilaktyki powoduje, że zagrożenie dla płodu stanowią mogą zarówno zakażenia pierwotne, reaktywacje zakażeń latentnych, jak i nadkażenia kolejnymi szczepami wirusa oraz możliwość występowania zakażeń mieszanych. Biorąc pod uwagę wysoki odsetek osób seropozytywnych dla hCMV, który jest odzwierciedleniem krążenia wirusa w populacji możemy wnioskować, że w naszym kraju zagrożenie wystąpienia zakażeń wrodzonych, czy też zakażeń okołoporodowych jest znaczne.

Biorąc powyższe pod uwagę, podjęcie przez Doktorantkę badań podstawowych, dotyczących określenia znaczenia wybranych markerów molekularnych w zakażeniach wrodzonych hCMV, było zadaniem bardzo ambitnym, doskonale wpisującym się w aktualne problemy i pozwalającym poszerzyć wiedzę dotyczącą tak istotnych zagadnień jaki stanowią zakażenia płodowe i okołoporodowe wywołane hCMV.

Najważniejsze informacje dotyczące wirusa cytomegalii Autorka pracy zawarła w bardzo obszernym bo aż dwudziestosześciostronicowym **Wstępie**. Doktorantka zamieściła w nim dane dotyczące klasyfikacji taksonomicznej hCMV, szczegółowe informacje o budowie wirusa i jego cyklu replikacyjnym. Opisała również problemy epidemiologii zakażeń wewnątrzmacicznych wywołanych wirusem cytomegalii i omówiła funkcje jakie spełnia łożysko w ograniczaniu transmisji zakażenia od matki do płodu. Bardzo szeroko Autorka pracy przedstawiła zagadnienia odpowiedzi immunologicznej wskazując na rolę poszczególnych elementów odpowiedzi w ochronie przed, względnie w ograniczaniu skutków zakażeń wrodzonych wywołanych zakażeniem hCMV, włączając funkcję kompleksu gCIII oraz receptorów RIG-I podobnych. Informacje zawarte we Wstępie pracy poparte zostały zacytowaniem aż 255 pozycji piśmiennictwa. Moim zdaniem niekonieczne było powoływanie się na tak dużą liczbę prac, biorąc pod uwagę, że jedynie 88/255 pozycji opublikowanych zostało w ciągu ostatnich pięciu lat. Mogę przypuszczać, że celem Autorki było pokazanie znajomości piśmiennictwa dotyczącego wirusa cytomegalii począwszy od lat pięćdziesiątych ubiegłego stulecia do roku 2018.

**Cel pracy.** Wiedza Doktorantki dotycząca zagadnień zakażeń hCMV nabytych w czasie życia płodowego lub postnatalnie, udokumentowana we Wstępie pracy, pozwoliła na wskazanie mało poznanych elementów, które mogą mieć określone konsekwencje w przebiegu tych zakażeń, co z kolei ułatwiło Jej wytyczenie kierunku prowadzenia badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej. Autorka rozprawy jasno sformułowała 2 główne cele badań, które zostały sprecyzowane w 4 podpunktach - celach szczegółowych.

Rozdział **Materialy i Metody** został opracowany bardzo starannie i zredagowany w sposób umożliwiający powtórzenie doświadczeń. Na pochwałę zasługuje sposób przedstawienia i zasady doboru pacjentów pediatrycznych oraz opis pochodzenia próbek klinicznych. Podkreślić należy niezwykłą dbałość Doktorantki o jakość prowadzonych badań. Mgr Agnieszka Jabłońska wyróżnia się znajomością wielu technik laboratoryjnych, począwszy od podstawowych metod wirusologicznych, takich jak prowadzenie hodowli komórkowych, namnażanie i mianowanie szczepów wirusowych, wykrywanie materiału genetycznego wirusów metodą PCR, po umiejętność prowadzenia hodowli narządowych oraz posługiwania się skomplikowanymi metodami określania ekspresji genów czy wykrywania polimorfizmu genów, co czyni z Niej bardzo wartościowego pracownika naukowego.

Rozdział **Wyniki** stanowi najobszerniejszą część rozprawy, zawarty został na 42 stronach maszynopisu. Rozpoczyna się od klinicznej i laboratoryjnej charakterystyki pacjentów, która została zamieszczona w tab. 12 (str. 70). W tym miejscu mam pewne zastrzeżenie, mianowicie prawie identyczna tabela, nr 2, została już umieszczona na str. 49, brak jej jedynie czwartej kolumny, podającej wartość P. Uważam, że należało zamieścić jedną, pełną wersję tabeli i zacytować ją zarówno w rozdziale Materiały jak i w rozdziale Wyniki. Ponadto w tab. 12 w wierszu trzecim, Zakażenie objawowe, jest błąd dotyczący odsetka noworodków z zakażeniem wrodzonym. Wynosi ona 100% a nie 96,8, ponieważ wady wystąpiły u 30/30 badanych noworodków.

Badania zostały zaplanowane logicznie, wyniki doświadczeń zostały skrupulatnie przedstawione w poprawnie opisanych tabelach i rycinach, do których w tekście Autorka zamieściła odnośniki, co pozwoliło osiągnąć zaplanowane cele. Doktorantka wykazała, że wszystkie genotypy kompleksu gCIII mają zdolność przenikania przez łożysko od matki do płodu i zmienność genetyczna szczepów wirusa nie wpływa na możliwość pokonania tej bariery, natomiast receptory RIG-I-podobne najprawdopodobniej pełnią istotną rolę w indukcji odpowiedzi immunologicznej. Porównanie częstości występowania genotypów hCMV w zakresie kompleksu gCIII u noworodków i niemowląt pozwoliło Autorce na stwierdzenie, że jest ona podobna w obu grupach badanych pacjentów i jedynie genotyp gL3 wykrywany jest znamienne częściej u noworodków z wadami wrodzonymi w odniesieniu do niemowląt z postnatalnym zakażeniem wirusem cytomegalii. Ponadto, otrzymane przez Autorkę wyniki wskazują, że pewne genotypy wirusa częściej od innych wykrywane są w objawowych zakażeniach wrodzonych, a inne w zakażeniach postnatalnych. Cenną obserwacją jest również, że niektóre genotypy hCMV mogą być kojarzone ze wzrostem ryzyka wystąpienia określonych objawów zakażenia CMV, np. genotyp G1 UL131A kojarzony jest z nieprawidłowościami w ośrodkowym układzie nerwowym. Należy podkreślić, że Doktorantka jako pierwsza w prezentowanej pracy opisała potencjalny związek między zakażeniem dziecka szczepami hCMV o genotypach w zakresie *lokus* UL128 oraz gL a ryzykiem wystąpienia objawów zakażenia CMV.

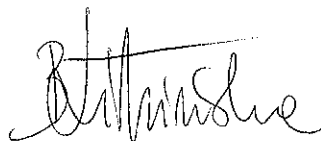
Otrzymane wyniki badań zostały poddane dokładnej analizie i rzetelnie przedyskutowane przez Doktorantkę. **Dyskusja** przeprowadzona jest w sposób uporządkowany, a zacytowane liczne prace, pozwalające na konfrontację wyników własnych z bogatym i odpowiednio dobranym piśmiennictwem, świadczą o bardzo dobrej znajomości zagadnień dotyczących konsekwencji zakażeń wywołanych hCMV w okresie płodowym i

nabytych w okresie okołoporodowym. Podsumowanie wyników badań zawarte w ostatnim akapicie Dyskusji pozwoliło Doktorantce na wyprowadzenie ośmiu **Wniosek**, które w pełni potwierdzają osiągnięcie zamierzeń zaplanowanych przez Autorkę pracy i stanowią kwintesencję przeprowadzonych badań.

Czytając pracę dopatrzyłam się zastosowania przez Doktorantkę pewnych określeń, których powinno się unikać. Podam niektóre przykłady: 1. str. 15 „centralny układ nerwowy” podczas gdy prawidłowy termin to – ośrodkowy układ nerwowy; 2. na tej samej stronie „wrodzony układ odpornościowy” – raczej nie mówimy o „wrodzonym układzie” lecz o odporności wrodzonej inaczej nazywanej naturalną lub nieswoistą; 3. str. 21 – lepiej brzmi nadkażenie innym szczepem hCMV niż stosowany przez Autorkę termin „superinfekcja”; 3. Doktorantka nagminnie używa określenia „odpowiedź specyficzna” podczas gdy w języku polskim jest dużo lepszy i bardziej precyzyjny termin – swoista odpowiedź; 4. str. 22 – lepiej byłoby nie pisać o „progresji w rozwoju zmian” lecz albo napisać rozwój albo progresja zmian; 5. str. 72 - skoro Autorka zrobiła podział dzieci pediatrycznych na grupę noworodków z zakażeniem wrodzonym oraz grupę niemowląt z zakażeniem postnatalnym nie należało napisać „W obu grupach badanych niemowląt stwierdzono...” lecz napisać - w obu grupach dzieci pediatrycznych stwierdzono...

Podane przykłady stanowią jedynie drobne uchybienia, a przedstawiona mi do recenzji praca wnosi nowe informacje dotyczące znaczenia określonych genów hCMV w rozwoju wad u dzieci zakażonych w czasie życia płodowego lub postnatalnie. Praca spełnia wymagania art. 13 Ustawy z dnia 13 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2014r, Nr 0, poz. 1852, z późn. zm.) Z pełnym przekonaniem przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi wniosek, o dopuszczenie mgr Agnieszki Jabłońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny pracy, jej zakres i aktualność problemu wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji dysertacji.



Warszawa, 2 listopada 2018

