WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

ZAKŁAD MEDYCYNY SPOŁECZNEJ
I ZDROWIA PUBLICZNEGO

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Hallmann
pt. *„Molekularne determinanty lekooporności szczepów wirusów grypy wywołujących zakażenia u ludzi w różnych sezonach epidemicznych w Polsce"*

W 1996 roku WHO wydała raport o *„Chorobach nowych i ponownie pojawiających się"*, zwracając uwagę na fakt, iż choroby zakaźne są nadal groźne i stanowią drugą przyczynę zgonów w skali globalnej, plasując się na owym drugim, niechlubnym miejscu tuż po zgonach z powodu chorób układu krążenia. O tym, iż nie wolno bagatelizować chorób zakaźnych dzisiaj, w kolejnym roku trwania pandemii COVID-19, nie trzeba już nikogo przekonywać. Grypa jest szczególną chorobą, ponieważ jako jedyna znalazła się na obu listach: chorób zakaźnych nowych – ze względu na fakt, iż w 1997 roku po raz pierwszy udowodniono, iż wirus grypy ptaków pokonał barierę międzygatunkową i zakaził 3-letniego chłopca w Hong Kongu, a także znajduje się na liście chorób zakaźnych ponownie pojawiających się – ze względu na potencjał epidemiczny i pandemiczny grypy. To właśnie grypa była nazywana *„ostatnią niekontrolowaną plagą ludzkości"*, choć wydaje się, że SARS-CoV-2 ją obecnie *„przyćmił"*, wywołując drugą w XXI wieku, a pierwszą znaną i opisaną w historii medycyny pandemię wywołaną koronawirusem. Jednak należy pamiętać i podkreślić, że kolejna pandemia grypy jest nadal możliwa, choć ograniczanie jej skutków może być łatwiejsze w związku z możliwością zastosowania leków działających przyczynowo w stosunku do wirusów grypy, zarówno w leczeniu, jak i w profilaktyce przed- czy poekspozycyjnej. Aktualnie problem lekooporności wirusów grypy, choć opisywany w piśmiennictwie naukowym, nie wydaje się być szczególnie powszechnym, szacuje się bowiem, że około 1% wirusów jest opornych na inhibitory neuraminidazy. Ta korzystna sytuacja może się jednak diametralnie zmienić, gdy leki te będą nadużywane lub niewłaściwie

stosowane, czego dowodzą doniesienia z Japonii, gdzie wskaźnik oporności na oseltamiwir sięgnął 18%. Konieczne jest zatem monitorowanie problemu lekooporności wirusów grypy, by móc zaplanować skuteczne postępowanie przeciwepidemiczne i terapeutyczne.

W świetle przedstawionych wyżej danych, podjęcie przez mgr Ewelinę Hallmann tematu nawiązującego do problemu lekooporności wirusów grypy, uważam za niezwykle aktualne, potrzebne i praktyczne. Wedle mojej najlepszej wiedzy jest to pionierska praca o tej tematyce w naszym kraju.

Praca ma strukturę standardową, składa się z wstępu, opisu materiału i metod, wyników, dyskusji, podsumowania, spisów rycin oraz tabel, piśmiennictwa. Proporcje pracy są prawidłowe.

We wstępnie Autorka przedstawiła strukturę i klasyfikację wirusów grypy, cykl replikacyjny oraz zmienność genetyczną wirusa, zasady nadzoru wirusologicznego oraz epidemiologicznego nad grypą, a także odniosła się do pandemii grypy oraz możliwości leczenia przyczynowego grypy, opisując zidentyfikowane mechanizmy lekooporności

Autorka sformułowała cel główny pracy, jakim było zbadanie lekooporności wirusów grypy krążących w Polsce poprzez określenie występowania mutacji w genie neuraminidazy (NA). Hipotezy badawcze testowane przez Autorkę obejmowały m.in. założenie, że problem lekooporności jest różnie nasilony w poszczególnych sezonach grypowych, a ze względu na słabiej wykształcony układ immunologiczny u dzieci, częstość mutacji związanych z lekopornością jest wyższa w tej grupie wiekowej.

Badania przeprowadzono w renomowanym ośrodku, Zakładzie Badania Wirusów Grypy NIZP-PZH, co nie pozostawia wątpliwości w kwestii ich wiarygodności. Ostatecznej analizie poddano próbki pozyskane z 193 materiałów klinicznych: 36 próbek od pacjentów zakażonych wirusem A/H1N1/pdm09, 100 próbek od pacjentów zakażonych wirusem A/H3N2 oraz 57 próbek od pacjentów zakażonych wirusem grypy typu B, próbki te zostały pobrane w ciągu trzech sezonów epidemicznych grypy: 2016/2017, 2017/2018, 2018/22019). Badania przeprowadzono przy użyciu metod biologii molekularnej, wykorzystując reakcję łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR), ponadto *real time* RT-PCR, elektroforezę uzyskanych produktów oraz sekwencjonowanie DNA metodą Sangera.

Analizy wyników dokonano z użyciem właściwie dobranych testów statystycznych, prawidłowo je interpretując.

Prezentacja wyników, obok dyskusji, stanowi najobszerniejszą część pracy. Wyniki zostały zaprezentowane w sposób uporządkowany, z użyciem tabel i rycin, co dodatkowo zwiększa ich atrakcyjność graficzną i przyczynia się do bardzo czytelnego ich odbioru przez

czytelnika. Autorka wykryła mutacje odpowiadające za lekooporność w 50% przebadanych próbek zidentyfikowała 28 typów mutacji związanych z lekoopornością. Doktorantka nie wykryła istotnych statystycznie różnic w częstości występowania lekooporności pomiędzy podtypami wirusa grypy typu A, natomiast stwierdziła że w przypadku wirusa grypy typu B częstość występowania mutacji odpowiadających za lekooporność jest istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do wirusa grypy typu A (47% vs 29%).

Analizując uzyskane wyniki, Autorka wykazała się umiejętnością krytycznej ich analizy i interpretacji, dokonała odniesienia wyników własnych do danych z piśmiennictwa światowego, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej i badawczej.

Dyskusja przeprowadzona jest w sposób interesujący, Autorka odnosi się w niej do wyników innych badaczy, również polskich. Za szczególnie cenne uznaję zdanie zamieszczone na str. 73 rozprawy: *„Zakład Badania Wirusów Grypy, Krajowy Ośrodek ds. Grypy potwierdził zdolność do zgłaszania danych do bazy GISAID, jednak przekształcenie tego procesu w rutynową działalność wymagałoby decyzji na poziomie krajowym i rozwiązań systemowych oraz stałego finansowania"*. Bez kontynuacji tego typu badań, nie pozyskamy więc aktualnej wiedzy na temat możliwości skutecznej terapii grypy.

Na podstawie analizy uzyskanych wyników, Autorka dokonała ich podsumowania, wskazując jak zostały ostatecznie zweryfikowane hipotezy badawcze. Potwierdzona została hipoteza mówiąca o zróżnicowaniu genetycznym pomiędzy typami wirusa grypy, nie potwierdzono hipotezy o większej podatności na występowanie mutacji niosących lekooporność wśród dzieci. Rozdział VI rozprawy nosi tytuł *„Podsumowanie i wnioski"*, przy czym wnioski ujęte są w sposób opisowy na stronie 78, proponowałabym ich doprecyzowanie w punktach, co jest bardziej czytelne i częściej praktykowane w dyzertacjach doktorskich.

Piśmiennictwo liczy 171 pozycji, głównie z ostatnich 10 lat i przede wszystkim anglojęzycznych, choć należy w aspekcie pozytywnym podkreślić cytowania prac polskich badaczy. Piśmiennictwo zostało prawidłowo dobrane i zacytowane, jego zakres świadczy o dobrej znajomości Autorki aktualnych wyników badań, które dotyczą omawianej w pracy problematyki.

Zwraca uwagę staranne i estetyczne opracowanie graficzne rozprawy.

Jakie są zatem uwagi do ocenianej pracy?

Rozprawa napisana jest poprawnie pod względem językowym, jednak Autorka nie ustrzegła się drobnych błędów interpunkcyjnych i stylistycznych, które wskazałam w

manuskrypcie. Praca powinna zostać uzupełniona o streszczenia – w języku polskim i w języku angielskim.

W przypadku wirusów grypy używa się terminologii fachowej: typ wirusa grypy (np. A, B, C), podtypy wirusa grypy typu A i linie wirusa grypy typu B. Czym więc Doktorantka kierowała się, pisząc o *„szczepach wirusa grypy"?*

W piśmiennictwie należało stosować jednolitą zasadę podawania skrótów czasopism (pojawiają się pełen nazwy, np. pozycja nr 2), cytując dane ze stron internetowych konieczne jest podanie daty wejścia (dotyczy np. pozycji 51). Konieczne jest także ujednolicenie interpunkcji w spisie piśmiennictwa.

Oczekiwałabym także od Doktorantki wyjaśnienia w dyskusji następujących kwestii: a) dlaczego do badania zostały wybrane te, a nie inne sezony epidemiczne grypy, b) czy Doktorantka uznaje liczbę zbadanych próbek za reprezentatywną? c) czym Doktorantka tłumaczy negatywną weryfikację hipotezy o częstszym występowaniu lekooporności wśród dzieci? d) czym Doktorantka tłumaczy zróżnicowanie genetyczne wirusów grypy w zależności od aspektu geograficznego (północ vs południe kraju?).

Opisane wyżej uwagi nie wpływają znacząco na pozytywną merytoryczną ocenę pracy, choć ich uwzględnienie może przyczynić się do podniesienia walorów manuskryptu.

Praca stanowi wyczerpujące, staranne i oryginalne opracowanie problemu naukowego, znacząco przyczynia się do zaktualizowania wiedzy, a wszystkie założone cele udało się Autorce zrealizować.

Podsumowując, stwierdzam iż przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone przepisami art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, tym samym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Eweliny Hallmann do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, dnia 28 grudnia 2021 roku

Prof. dr hab. n. med. Aneta Nitsch-Osuch

prof. dr hab. n. med. Aneta Nitsch-Osuch
specjalista pediatra
specjalista epidemiolog
specjalista zdrowia publicznego
5179091