

**Prof. dr hab. Łukasz Adaszek**  
**Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych**  
**Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie**

---

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr. inż. Pawła Mirosława**

**„Charakterystyka molekularna szczepów wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVDV) oraz analiza transkryptomu komórek zakażonych tym wirusem”**

Wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych (ang. bovine viral diarrhoea virus – mucosal disease - BVDV-MD) należy do rodziny *Flaviviridae*, rodzaju Pestivirus. Wywoływana przez niego choroba występuje na całym świecie i jest przyczyną znacznych strat ekonomicznych w hodowli bydła. Szacuje się, że w Europie częstość występowania zwierząt serologicznie dodatnich w krajach bez systematycznej kontroli wirusowej biegunki bydła wynosi od 60 do 85%, dlatego wszelkie badania poświęcone zakażeniom BVD, mechanizmom chorobotwórczości oraz drogom szerzenia się wirusa wydają się być w pełni uzasadnione.

W przesłanej do oceny pracy doktorskiej mgr. inż. Paweł Mirosław przedstawił wyniki badań poświęconych charakterystyce molekularnej szczepów BVDV oraz badań nad transkryptomem komórek nim zakażonych.

Układ redakcyjny ocenianej dysertacji odpowiada wymogom stawianym pracom naukowym. Liczy ona 142 strony wydruku komputerowego, w tym streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, i piśmiennictwo. Dokumentacja jest bardzo bogata i obejmuje 29 rycin i 12 tabel umiejętnie włączonych w tekst pracy.

Praca porusza interesujące zagadnienia zarówno z praktycznego, jak i naukowego punktu widzenia. Dotyczy choroby o dużym znaczeniu ekonomicznym, stanowiącej zagrożenie dla hodowli bydła na świecie. Fakt, iż mimo podjętych szerokich prób opanowania ognisk BVD-MD, choroba w dalszym ciągu notowana jest na całym świecie, w tym w Polsce, stanowi wystarczający i uzasadniony powód podjęcia przez Doktoranta badań. Decyzję o realizacji przedstawionych w pracy badań podjął on z pełną świadomością spodziewanych trudności zwłaszcza związanych z nakładem pracy oraz interpretacją znacznej ilości wyników

badania molekularnych i genetycznych, ale i z nadzieją że wyniki przeprowadzonych badań przyczynią się do lepszej charakterystyki szczepów wirusa i lepszego poznania jego chorobotwórczości.

Dotychczasowe opracowania dotyczące wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych odnoszą się w większości do prewalencji zakażeń tym patogenem w populacji rodzimego bydła. W zasadzie do tej pory tylko w nielicznych pracach zaprezentowano szczegółową charakterystykę molekularną polskich szczepów BVDV, a tym bardziej nie analizowano transkryptomu komórek zakażonych tym wirusem. Dlatego też badania Doktoranta należy uznać za nowatorskie, przyczyniające do lepszego poznania choroby i jej czynnika etiologicznego.

W tym kontekście podjęcie przez mgr. inż. Pawła Mirosława badań dotyczących zagadnień zaprezentowanych w tytule pracy należy uznać za trafne i w pełni uzasadnione zarówno w aspekcie poznawczym, jak i praktycznym.

Pracę rozpoczyna, poprzedzony streszczeniem w języku polskim i angielski, spisem treści oraz wykazem skrótów, trzydziestostronicowy wstęp. Wydaje się, że ta część doktoratu jest zbyt obszerna, jednak by móc właściwie zrozumieć ideę badań mgr. inż. Pawła Mirosława konieczne było przedstawienie we wstępie dokładnego i przejrzystego opisu technik i problemów badawczych, które stanowiły ich sedno. We wstępie Doktorant przedstawił szczegółowo opis wirusa BVD-MD, wykorzystanie mikromacierzy w analizie profili ekspresji genów, a także zjawiska odporności wrodzonej i nabytej w stosunku do omawianego patogenu. Pomimo znacznej objętości, wstęp powinien zostać uzupełniony o informacje dotyczące sytuacji epizootycznej BVD-MD w Polsce, co pokazało by jak istotny jest to problem w populacji rodzimego bydła i dlaczego badania nad tą chorobą mają tak duże znaczenie.

Wstęp wskazuje na dobrą znajomość przez Doktoranta badanej tematyki i piśmiennictwa. W zasadzie jest on tak napisany, że uzasadnia celowość prowadzenia zaproponowanych przez Doktoranta badań i pozwala na sformułowanie ich ostatecznego celu, który logicznie wypływa z przedstawionego we wstępie opisu. Badania prezentowane w tej pracy miały na celu charakterystykę molekularną izolatów terenowych wirusa biegunki bydła (BVD) oraz podjęcie próby zbadania zmian poziomów ekspresji genów i identyfikację aktywowanych lub tłumionych szlaków metabolicznych oraz sygnałowych na wczesnym etapie zakażenia hodowli komórkowej wirusem BVD.

W Rozdziale „Materiały i Metody”, liczącym 20 stron Autor opisał użyte w pracy materiały oraz metodyki badawcze. Przedstawił metodykę badań filogenetycznych oraz analizę transkryptomyczną, opisując dokładnie każdy z etapów prowadzonych analiz.

Badania molekularne i filogenetyczne przeprowadzono na reprezentatywnej ilości próbek (9290 próbek). Ich metodyka została przedstawiona właściwie, aczkolwiek niepotrzebnie Doktorant opisywał szczegółowo rozdział elektroforetyczny produktów PCR (podrozdział 3.1.4). Elektroforeza jest dziś rutynowo wykonywaną techniką, więc w mojej opinii wystarczyłoby jedynie napisać w pracy, że produkty PCR były analizowane w procesie elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym. W przypadku podrozdziału 3.1.3 bardziej trafnym tytułem niż „Przygotowanie RT-PCR”, wydaje się „Przeprowadzenie RT-PCR”. Doktorant nie optymalizował metody, posługiwał się starterami dostępnymi w publikacjach, więc trudno tu mówić o samodzielnym przygotowaniu tego badania.

Spośród dodatnich próbek BVDV, dla których uzyskano produkty amplifikacji w obrębie 5'UTR do amplifikacji regionu E2 wybrano tylko 30. W tekście pracy należałoby wytłumaczyć dlaczego akurat taka liczba próbek była analizowana dla genu E2, a nie wszystkie dodatnie dla 5'UTR.

W rozdziale „Analiza transkryptomiczna”, w podrozdziale 3.2.4. Autor nie podaje co stanowiło wzorzec mas wykorzystywany przy pomiarze stężenia RNA, a także jakiego barwnika użyto podczas tej procedury.

Ogólnie rozdział „Materiał i Metody”, choć dość obszerny, napisany jest bardzo przejrzysto, dzięki czemu badania przeprowadzone przez Doktoranta mogą być bez większego problemu powtórzone przez innych badaczy. Na szczególne uznanie zasługuje bardzo jasno i rzeczowo opisanie badania z wykorzystaniem mikromacierzy, zwłaszcza w odniesieniu do późniejszej analizy uzyskanych wyników.

Wyniki stanowią najbardziej rozbudowaną część doktoratu. Zostały one przedstawione na 37 stronach tekstu, w który umiejętnie włączono ryciny i tabele, starannie opracowane i czytelne.

W pierwszej części wyników Autor przedstawił pokrewieństwo badanych szczepów terenowych oraz referencyjnych BVDV. Doktorant wykazał, że wszystkie szczepy wirusa należały do gatunku BVDV-1 oraz do siedmiu podtypów 1b, 1g, 1f, 1d, 1r, 1s i 1e.

Zwierzęta z tego samego stada były zakażone tym samym podtypem, a procent identyczności sekwencji między izolatami wirusa na poziomie stada był bardzo wysoki. Wyniki badań filogenetycznych zestawiono w postaci dendrogramów prezentujących podobieństwo sekwencji nukleotydowych badanych odcinków genów wirusa. W tej części

pracy Doktorant nie przedstawił nigdzie rycin obrazujących wyniki rozdziału elektroforetycznego produktów amplifikacji, co w mojej ocenie powinno się znaleźć w doktoracie, tym bardziej, że w Materiałach i metodach dość szczegółowo opisał proces elektroforezy.

W dalszej części Wyników Doktorant przedstawił profil ekspresji genów komórek MDBK eksperymentalnie zakażonych wirusem BVD wykorzystując do tego celu metodę oligonukleotydowych mikromacierzy ekspresyjnych. Ta część pracy została wykonana i zaprezentowana doskonale. Świadczy o dużym potencjale Doktoranta jako badacza, który wykorzystuje nowoczesne techniki badawcze i potrafi właściwie interpretować ich wyniki, co w przypadku badań nad zmianami ekspresji genów wcale nie jest proste. Analiza zmiany profilu ekspresji genów komórek MDBK 24 i 72h po zakażeniu szczepem cytopatycznym (cp) wirusa wykazała, że wzmożonej ekspresji ulegały geny kodujące chemokiny GRO1 (CXCL1) oraz CXCL8 (IL-8). Największy spadek poziomu ekspresji dotyczył genu kodującego asporynę (ASPN), genu kodującego kasetę białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM2) oraz genu kodującego S-transferazę glutationu A2 (GSTA2). Geny o zwiększonej ekspresji powiązane były z procesami regulacji biologicznej i procesami komórkowymi oraz ich regulacją. W przypadku genów o obniżonej ekspresji można zauważyć, że większa ich część związana jest z procesami metabolicznymi. Główną funkcją molekularną tych genów jest wiązanie białek, a także aktywność katalityczna.

Ta sama analiza z wykorzystaniem szczepów niecytopatycznych (ncp) BVDV wykazała w zakażonych komórkach MDBK zwiększoną ekspresję genów biorących udział w procesach biologicznych i komórkowych oraz w regulacji tych procesów. Spośród genów o obniżonej ekspresji większa ich część była związana z procesami metabolicznymi.

Mgr. inż. Paweł Mirosław wykazał, że pod wpływem zakażenia szczepami ncp zmianom ekspresji uległo mniej genów niż w następstwie zakażenia szczepami cp. Tym samym zakażenie szczepami ncp miało znacznie mniejszy wpływ na funkcjonowanie komórek niż zakażenie szczepem cp. Zakażenie szczepem cp wywołało znacznie wyższe zmiany poziomów ekspresji genów niż szczepami ncp. Geny regulowane wskutek zakażenia szczepem cp wzbogaciły większą ilość szlaków niż te regulowane przez szczepy ncp co potwierdza ich duży wpływ na funkcjonowanie komórek, zmiany degeneracyjne, czy wejście w proces apoptozy. Zakażenie szczepem cp w przeciwieństwie do zakażenia szczepami ncp

wywołało również wzbogacenie szlaków związanych z układem immunologicznym oraz szlaków związanych z metabolizmem.

W przypadku obu biotypów wirusa, po zakażeniu komórek MDBK wzbogacone zostały szlaki odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy.

W liczącym 28 stron rozdziale „Dyskusja” Doktorant podkreślił, że przeprowadzone badania są jednymi z niewielu dotyczących analizy filogenetycznej BVDV w Polsce. Ich wyniki wskazują, że liczba podtypów BVDV w Polsce wzrosła, ale BVDV-1b jest nadal podtypem dominującym. Wyniki badań Doktoranta nie potwierdzają by rodzime bydło ulegało zakażeniu BVDV-2 i BVDV-3. Co ciekawe zakażenia BVDV Doktorant zanotował w 6 stadach, w których stosowano immunoprofilaktykę swoistą przeciwko chorobie w oparciu o preparaty inaktywowane zawierające BVDV-1a, co może wskazywać na brak skuteczności tego typu szczepień.

W dyskusji Doktorant podkreślił, że analiza transkryptomu komórek MDBK zakażonych wirusem BVD pozwoliła na wyodrębnienie szeregu genów, których ekspresja uległa zmianie w wyniku zakażenia, przy czym wirus BVD jest w stanie indukować zmiany ekspresji zróżnicowanej liczby genów w zależności od rodzaju komórek, w których się namnaża. Ponadto niecytopatyczne szczepy wirusa BVD, które stanowią zdecydowaną większość szczepów izolowanych od zwierząt, wywołują mniej nasilone zmiany na poziomie transkryptomu niż szczepy cytopatyczne.

Mgr. inż. Paweł Mirosław, poprawnie i umiejętnie podjął próbę krytycznej analizy i oceny uzyskanych wyników, konfrontując je z literaturą źródłową. W części dyskusji dotyczącej badania transkryptomu odnosi się wrażenia, że nieco zbyt często Autor powtarza informacje zaprezentowane już w wynikach, zamiast skupić się na konfrontowaniu własnych rezultatów z danymi literaturowymi. Po części wynika to z faktu, iż nie ma wielu publikacji na tym polu. Niemniej jednak w mojej ocenie w pracy powinny znaleźć się odniesienia do publikacji dostępnych w bazach internetowych jak: „Liu C, Liu Y, Liang L, Cui S, Zhang Y.: RNA-Seq based transcriptome analysis during bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection. BMC Genomics. 2019 Oct 24;20(1):774”, czy “Lopez BI, Santiago KG, Lee D, Ha S, Seo K.: RNA Sequencing (RNA-Seq) Based Transcriptome Analysis in Immune Response of Holstein Cattle to Killed Vaccine against Bovine Viral Diarrhea Virus Type I. Animals (Basel). 2020 Feb 21;10(2):344”.

Doktorant dowiódł nie tylko bardzo dobrej znajomości badanej problematyki, ale również umiejętności weryfikacji wyników badań własnych w kontekście wyników uzyskanych przez innych autorów. W dyskusji Autor przedyskutował w zasadzie każdy aspekt prowadzonych badań. Na uznanie zasługuje sposób, w jaki mgr. inż. Paweł Mirosław wytłumaczył wpływ zakażeń BVDV (zarówno cp, jak i ncp) na przebieg cyklu komórkowego, nasilenie apoptozy, przebieg procesów metabolicznych, procesów immunologicznych i homeostazy organizmu. Pozwala to lepiej poznać patogenezę wirusowej biegunki bydła i choroby błon śluzowych oraz powoduje, że praca ma wydzźwięk praktyczny – umożliwiając lepsze zrozumienie istoty tej choroby.

Praca zakończona jest pięcioma wnioskami, które logicznie wynikają z kontekstu doktoratu i stanowią jego podsumowanie.

Wykaz piśmiennictwa krajowego i zagranicznego jest bardzo bogaty, (liczy 305 pozycji), co świadczy o zdolności doboru właściwych materiałów źródłowych do analizy wyników i dyskusji w ramach tematyki będącej przedmiotem badań.

Reasumując stwierdzam, że przedstawione w pracy zagadnienia stanowią ważne uzupełnienie dotychczasowej wiedzy dotyczącej zmienności genetycznej BVDV i patogenezę wirusowej biegunki bydła i choroby błon śluzowych. Uzyskane wyniki są w mojej ocenie wartościowe zwłaszcza z uwagi na fakt, iż jest to pierwsze tego typu opracowanie zwłaszcza dotyczące badań nad transkryptomem BVDV w Polsce. Praca zawiera elementy nowatorskie, została wykonana metodycznie poprawnie, a wyniki badań mają duże znaczenie poznawcze.

Oczywiście szczegółowa analiza rozprawy ujawnia pewne niedociągnięcia na które częściowo zwróciłem uwagę w treści recenzji

Autor powinien być bardziej precyzyjny w stosowaniu terminologii weterynaryjnej. np. na str. 8 pisze „główne objawy to: przemijające leukopenia...”. Leukopenia nie jest objawem, tylko nieprawidłowością hematologiczną. Na str. 9 zamiast „większość zwierząt zdrowiała”, lepiej użyć słów „większość zwierząt powracała do zdrowia”. Na str. 21 Doktorant pisze „wirusy to obligatoryjne pasożyty” co nie jest prawdą. Pasożyty to organizmy komórkowe, do których z pewnością nie zalicza się wirusów.

Te i wcześniejsze uwagi mają w większości charakter porządkowy i nie wpływają na pozytywną ocenę recenzowanej rozprawy. Doktorant włożył wiele pracy w wykonanie badań, wywiązując się w pełni z zadań określonych w celach badawczych.

W konkluzji stwierdzam, że praca doktorska pt.: **”Charakterystyka molekularna szczepów wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVDV) oraz analiza transkryptomu komórek zakażonych tym wirusem”** odpowiada warunkom określonym w

art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr. inż. Pawła Mirosława do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie w związku z tym, iż praca jest nowatorska dotyczy bardzo aktualnego problemu w hodowli bydła, a zaprezentowane w niej wyniki mają szansę być szeroko cytowanymi, (co po części już ma miejsce np. w pracy Gao X, Niu C, Wang Z, Jia S, Han M, Ma Y, Guan X, Wang L, Qiao X, Xu Y.: Comprehensive analysis of lncRNA expression profiles in cytopathic biotype BVDV-infected MDBK cells provides an insight into biological contexts of host-BVDV interactions. Virulence. 2021 Dec;12(1):20-34.) wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej stosowaną nagrodę Dyrektora PIW-PIB w Puławach.

Lublin, 16 kwietnia 2021



Prof. dr hab. Łukasz Adaszek

prof. dr hab. Łukasz Adaszek  
Lekarz weterynarii  
20-470 Lublin, ul. Nalkwskich 104/22  
tel. 502-703-622

60300