

Warszawa, 10.05.2021

prof. dr hab. Jarosław Kaba, Dip.ECSRHM
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja

rozprawy doktorskiej pana mgr. inż. Pawła Mirosława

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

Recenzowana praca została przygotowana w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach pod opieką promotora dr. hab. Mirosława Polaka i promotora pomocniczego dr hab. Marzeny Rola-Łuszczak. Podstawą prawną do wykonania niniejszej recenzji jest Uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynarii – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 26.10.2018 roku.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma tradycyjną formę maszynopisu, ze standardowym układem rozdziałów.

Tematem pracy są zagadnienia związane z charakterystyką genetyczną i właściwościami szczepów wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVDV) pochodzących z różnych regionów Polski. Zakażenia wirusem BVD występują powszechnie w stadach bydła w naszym kraju i na całym świecie, a kliniczna postać choroby prowadzi do poważnych strat ekonomicznych. Wiadomo również, że zmienność genetyczna wirusów prowadzi do trudności w diagnostyce zakażeń oraz wpływa na skuteczność szczepień. Wydaje się więc, że podjęcie przez Doktoranta prac związanych z badaniem różnych, polskich szczepów wirusa jest w pełni uzasadnione.

W rozdziale „Wstęp” szczegółowo scharakteryzowano sam wirus, omówiono możliwości wykorzystania mikromacierzy w badaniach ekspresji genów oraz scharakteryzowano procesy odpornościowe zachodzące w trakcie zakażenia BVDV.

Charakteryzując BVDV podano jego systematykę i przedstawiono także pozostałe wirusy należące do rodzaju *Pestivirus*. Dobrym pomysłem było opracowanie drzewa filogenetycznego w oparciu o fragmenty kodujące część poliproteiny pestiwirusów. W tej części pracy podano także podstawowe informacje epidemiologiczne dotyczące choroby (źródło zakażenia, drogi szerzenia się) oraz krótko omówiono jej przebieg. Tu pojawiają się pewne, drobne nieścisłości. Doktorant wspomina jedynie o przebiegu klinicznie jawnym, nie wspominając o tak ważnym w tym przypadku przebiegu subklinicznym choroby. Użyte stwierdzenie „Infekcja ostra ma zazwyczaj przebieg łagodny i często może pozostawać niezauważona” (str. 8) jest niewłaściwe - przeczy samo sobie. Niefortunne jest również zdanie „Pestiwirusy są wydalane we wszystkich wydalinach i wydzielinach zwierząt zakażonych trwale” (str. 9) – słowo „wydalane” powinno być zastąpione np. słowem „obecne”. Zdanie „... u zwierząt zakażonych nie można wykryć przeciwciał swoistych dla wirusa ani limfocytów T lub B.” (str.10) jest także niezrozumiałe. Należy jednak pamiętać, że recenzowana praca doktorska jest poświęcona charakterystyce samego wirusa, a nie chorobie, a więc zdecydowanie te niedopatrzenia należy uznać za mało istotne.

Bardzo szczegółowo w pracy omówiono budowę samego wirusa poświęcając dużo miejsca opisowi roli białek kodowanych przez wirus, co jest w oczywisty sposób uzasadnione tematyką pracy. Dokładnie i w jasny sposób opisane zostały mechanizmy powodujące pojawianie się biotypu cytopatycznego BVDV, co jak wiadomo odgrywa kluczową rolę w patogenezie BVD-MD. Dużo miejsca poświęcono opisowi zróżnicowania genetycznego wirusa BVD oraz metodyki badania.

Elementem pracy doktorskiej była analiza transkryptomu z wykorzystaniem techniki mikromacierzy. We wstępie omówiono więc dokładnie tę problematykę. W jasny i zrozumiały sposób przedstawiono podstawowe informacje dotyczące mechanizmów regulacji ekspresji genów. Więcej miejsca poświęcono samej technice mikromacierzy. Omówiono rodzaje sond stosowanych w tej metodzie badawczej, sposoby ich umieszczania na płytce oraz zasady odczytu i analizy uzyskanych danych. W tym ostatnim opisie warto poprawić sformułowanie „...przeprowadzając testy t-studenta specyficzne dla genu...” (str. 28).

Bardzo dokładnie omówiono procesy odpornościowe wywoływane przez BVDV. Przedstawiono procesy związane z rozpoznaniem antygenu oraz odpowiedzią immunologiczną zarówno wrodzoną jak i nabytą. Tu warto poprawić sformułowanie „...wrodzony układ odpornościowy...” (str. 37 i inne).

Cel pracy został w sposób jasny i jednoznaczny określony.

Materiał do badań stanowiło ponad dziewięć tysięcy próbek. Myślę, że opisując materiał należało podać również informacje na temat liczby stad, z których pochodziły te próbki, liczby próbek pobranych w każdym stadzie oraz ich przybliżonej lokalizacji. Dane te znalazły się dopiero w rozdziale Wyniki (tab. 4).

Dokładnie opisano metody izolacji RNA, wykonania badań metodą RT-PCR, rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji, sekwencjonowania i analizy uzyskanych wyników.

Podano także wszelkie niezbędne informacje dotyczące przeprowadzonej analizy transkrypcyjnej. W badaniach wykorzystano dwa terenowe niecytopatyczne szczepy wirusa BVD oraz szczep referencyjny (cytopatyczny). Doktorant niezwykle dokładnie opisał metodykę zakażenia hodowli komórkowych, izolacji RNA oraz wszystkich etapów badania techniką mikromacierzy. Opisując analizę statystyczną podał, że wykorzystano „test t-studenta przy poziomie istotności $p \leq 0,05$ ” (np. str. 55, str. 72, str. 80 i inne). Sformułowanie to nie jest właściwe. Powszechnie używa się sformułowania „na poziomie istotności”, a także trzeba pamiętać, że wartość p (prawdopodobieństwo testowe) to nie to samo co poziom istotności (α).

Otrzymane wyniki analizy transkrypcyjnej porównano z wynikami badań przeprowadzonych za pomocą metody RT-qPCR. Użyte w opisie metodyki sformułowania „walidacja wyników” wydaje się być niefortunne. W innych częściach pracy zamiast tego słowa użyto pojęcia „potwierdzenie”, które jest zdecydowanie trafniejsze.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w bardzo szczegółowy i logiczny sposób z wykorzystaniem czytelnych tabel i starannie przygotowanych rycin. Są one niezwykle rzetelnie udokumentowane. W 30 stadach, w których przeprowadzono badania stwierdzono siedem podtypów wirusa BVD-1. Podtypy 1s i 1r zostały wykryte po raz pierwszy w Polsce. Informacje te w istotny sposób poszerzają

wiedzę dotyczącą epidemiologii choroby w Polsce. Przeprowadzone badania wykazały, że zakażenie komórek zarówno szczepem cytopatycznym jak i niecytopatycznym wpływa na ekspresję wielu genów. Szczep cytopatyczny wywołał ekspresję większej liczby genów, a sama ekspresja była również silniejsza. Wykazano, że zakażenie szczepem cytopatycznym jak i niecytopatycznym wpływało na ekspresję różnych genów. Obserwacje te są bardzo ważne. Uzupełniają one współczesną wiedzę na temat patogenezy BVD-MD.

Wyniki badań zostały poddane bardzo obszernej i rzetelnej dyskusji. Doktorant wykorzystał starannie dobrane publikacje, których zdecydowana większość ukazała się w ciągu ostatnich dziesięciu lat.

W pracy sformułowano 5 wniosków. Są one jednoznacznie powiązane z wynikami przeprowadzonych badań i poparte właściwie przeprowadzoną dyskusją. Wnioski są właściwie sformułowane. Mam jedynie zastrzeżenia do drugiego z nich. Moim zdaniem jest zbyt daleko posunięty. Opisane w pracy badania miały charakter badań *in vitro* i byłbym bardziej ostrożny w bezpośrednim przenoszeniu ich wyników na poziom kliniczny.

Ujednolicenia wymaga także sposób podania piśmiennictwa.

W pracy zauważyłem także kilka sformułowań, które moim zdaniem należy skorygować. Może zamiast słowa „transmisja” (np. transmisja pionowa - str. 9, transmisja choroby - str. 20) lepiej użyć słowa „szerzenie się”. Warto też zastąpić słowo „specyficzny” (np. BVDV nie jest specyficzny dla jednego gospodarza - str. 9, specyficzne przeciwciała - str. 13, przeciwciała specyficzne dla glikoproteiny - str. 20, startery specyficzne dla regionu - str. 40) słowem „swoisty”, skoro nie mówimy (jeszcze?) o „odporności specyficznej” a używamy (wciąż?) terminu „odporność swoista”. Dla łatwiejszego odbioru pracy można też stracić się unikać skomplikowanych i obco brzmiących sformułowań (np. indukując aktywację biologiczną komórek - str. 31, dysregulacja autofagii - str. 121). Warto także unikać dość powszechnych błędów popełnianych w pracach naukowych (np. „globalny profil” str. 71, globalny oznacza, że badania przeprowadzono na całym świecie; „większa ilość szlaków” - str. 91, w przypadku rzeczy policzalnych mówimy o liczbie; „zakaźność wirusa” - str. 121, każdy wirus jest czynnikiem zakaźnym, ale mogą się od siebie różnić zaraźliwością).

Podkreślam, że wszystkie moje uwagi krytyczne mają charakter językowy i nie odnoszą się do merytorycznej strony pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Temat badań został wybrany bardzo trafnie i poparto go dobrze przeprowadzonym przeglądem piśmiennictwa. Cel pracy został poprawnie sformułowany. Metodyka badań jest właściwa. Wyniki zostały rzetelnie udokumentowane, w bardzo czytelny sposób przedstawione i właściwie przedyskutowane. Wnioski wynikają z uzyskanych wyników badań. Praca jest bardzo obszerna i dobrze napisana. Stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i w sposób znaczny wpływa na poszerzenie wiedzy dotyczącej wirusa BVD. Doktorant bezspornie wykazał się bardzo dużą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnościami samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Biorąc powyższe pod uwagę, z przyjemnością stawiam wniosek o wyróżnienie recenzowanej pracy stosowną nagrodą.

Stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska pana mgr. inż. Pawła Mirosława na temat „Charakterystyka molekularna szczepów wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych (BVDV) oraz analiza transkryptomu komórek zakażonych tym wirusem” odpowiada warunkom określonym w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. 2018 poz.1668 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję o dopuszczenie pana mgr. inż. Pawła Mirosława do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Jarosław Kaba, Dip.ECSRHM