

Prof. dr hab. Zbigniew Grądzki
Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie

Ocena
rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Urbaniak
pt. „Replikacja wirusa grypy ptaków w organizmie świni”

Grypa jako choroba zakaźna i zaraźliwa, tak u człowieka jak i u zwierząt, postrzegana jest jako jednostka o ważnym znaczeniu klinicznym i epidemiologicznym. W epidemiologii istotna jest zwłaszcza możliwość wywoływania przez wirusy grypy zakażeń masowych typu pandemii, obejmujących zasięgiem całe kontynenty, a związanych z jednej strony z potencjałem tworzenia nowych wariantów genetycznych o zmienionej strukturze antygenowej, z drugiej natomiast z przełamywaniem przez „nowe” wirusy odporności populacyjnej. Niestety, nawet stale udoskonalane programy profilaktyki swoistej grypy z udziałem szczepionek najnowszych generacji wykazują częściową skuteczność tylko w zapobieganiu tzw. grypie sezonowej, pozostając bezsilnymi w przypadku pojawienia się szczepów pandemicznych. W dobie globalizacji do istniejących zagrożeń dołączają się jeszcze inne, związane ze zwiększoną możliwością ekspozycji ludzi i zwierząt na egzotyczne niekiedy wirusy, zwłaszcza pochodzące z terenów Dalekiego Wschodu. Nie sposób pominąć także znaczenia najważniejszego ogniwa w łańcuchu epidemiologicznym grypy, jakim są ptaki wolno-żyjące, dysponujące największymi możliwościami w zakresie tworzenia zróżnicowanych genetycznie wirusów grypy.

Świnka jako gatunek bliski człowiekowi jest również ważnym ogniwem w łańcuchu zakażeń, łączącym dzikie ptactwo, będące naturalnym rezerwuarem prawie wszystkich poznanych dotychczas podtypów wirusa grypy z pozostałymi wrażliwymi gatunkami łącznie z człowiekiem. Ważna jest także rola trzody chlewnej jako gatunku pełniącego funkcję biologicznego miksera i w efekcie generującego nowe podtypy wirusów grypy, często o potencjale pandemicznym.

W tym kontekście podjęcie przez Doktorantkę badań nad replikacją wirusa grypy ptaków w organizmie świni należy uznać za pomysł trafny i interesujący tak z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia. Ponadto, badania te wydają się wypełniać lukę w obszarze wiedzy nt. międzygatunkowej transmisji wirusów grypy, jaką można dostrzec analizując zagraniczne i krajowe piśmiennictwo z tego zakresu.

Recenzowana praca ma układ typowy dla prac doktorskich. Zawiera 147 stron tekstu w dwustronnym wydruku komputerowym, podzielonego na 10 głównych rozdziałów, w obrębie których wyodrębniono dodatkowe podrozdziały. Pracę poprzedza wykaz użytych w tekście skrótów. Warto ten fakt podkreślić zwłaszcza, że we współczesnych opracowaniach

naukowych pojawia się wiele określeń zapożyczonych z terminologii anglojęzycznej, od których tworzone są uniwersalne skróty odnoszące się np. do elementów struktury i nazw mikroorganizmów, metod badawczych, parametrów reakcji chemicznych, nazw odczynników itp. Włączenie do tekstu rozprawy przewodnika po tych zawiłościach językowych ułatwia jego czytanie i analizę, a Autorowi pozwala pominąć wielokrotne rozwijanie i tłumaczenie używanych skrótów. Rozprawa opatrzona jest także streszczeniem przedstawionym w języku polskim i angielskim, zawierającym syntetyczny opis trzech głównych eksperymentów przeprowadzonych w ramach realizacji badań własnych.

Wstęp rozprawy jest przeglądem aktualnej wiedzy nt. grypy jako choroby zakaźnej i zaraźliwej oraz nt. wirusów grypy jako czynników etiologicznych tej choroby. Z analizy tej części pracy wynika, że Autorka dysertacji jest dobrze zorientowana w problematyce jaką się zajmuje, ma dużą wiedzę wypływającą ze znajomości piśmiennictwa z zakresu grypy u zwierząt i człowieka oraz, co godne uwagi, opiera ją na najnowszych opracowaniach publikowanych w renomowanych czasopismach anglojęzycznych.

W opinii recenzenta proporcjonalnie Autorka zbyt wiele miejsca poświęciła we wstępie szczegółowemu opisowi struktury oraz funkcji poszczególnych białek wirusa grypy kosztem informacji ściślej wiążących się z tematem rozprawy, tj. możliwościom transmisji międzygatunkowej i replikacji wirusa grypy ptaków u nowego gospodarza. Wprawdzie, jak twierdzi Autorka zagadnienia te są w odniesieniu do wirusów ptasich słabo poznane, tym niemniej na bazie istniejących hipotez można było własne rozważania na ten temat bardziej rozbudować. Warto natomiast zwrócić uwagę na zamieszczone we wstępie schematy budowy wirusa grypy oraz cyklu replikacyjnego, pochodzące z opracowań firmowanych przez Doktorantkę.

W podrozdziale 2.4., odnoszącym się do zmienności wirusa grypy Autorka pisząc nt. skoku antygenowego, przybierającego formę reasortacji genetycznej, powinna zaznaczyć, że nowe podtypy wirusa powstają wówczas gdy wymiana materiału genetycznego dotyczy segmentów 4 i 6, kodujących odpowiednio HA i NA.

Znaczenie świń w epidemiologii grypy jest fundamentalne i związane jest z różnorodnością receptorów komórkowych dla tych zarazków. W opinii recenzenta zagadnienie to zostało potraktowane marginalnie chociaż wiadomo, że warunkuje ono możliwość generowania w organizmie świni zmienionych genetycznie i antygenowo nowych wariantów wirusa grypy, często należących do różnych podtypów (mixing vessel). Informacje na ten temat pojawiają się wprawdzie w rozdziale „Dyskusja”, jednak swoją naturą bardziej pasują do wprowadzenia, które stanowi wstęp.

Podrozdział 2.5. wstępu napisany jest w nieco odmiennej konwencji w porównaniu do pozostałych podrozdziałów, ponieważ dotyczy aspektu zoonotycznego tylko wirusów grypy świń. Wszystkie wcześniejsze rozważania nt. wirusów grypy odnosiły się ogólnie do wirusów typu A bez zróżnicowania gatunkowego. Być może jednak Doktorantka chciała w ten sposób zwrócić większą uwagę na rolę gatunku, którym się zajmowała.

Uzasadnienie podejmowanych badań oparte jest na znanym fakcie udziału świń w międzygatunkowej transmisji wirusów grypy, przez co gatunek ten stanowi główne ogniwo w łańcuchu epidemiologicznym choroby. Doktorantka w swoich badaniach nie poprzestaje jednak wyłącznie na potwierdzeniu tego zjawiska, ale stosuje podejście analityczne, starając się odpowiedzieć na pytanie jakie procesy na poziomie molekularnym oraz które elementy strukturalne wirusa grypy ptaków decydują o jego adaptacji do organizmu świni oraz późniejszej transmisji wewnątrzgatunkowej. Tak nakreślony plan pracy należy uznać za bardzo ambitny, pracochłonny i zapewne także kosztochłonny. Nie dziwi zatem fakt, że prezentowane badania były finansowane z projektu europejskiego.

W rozdziale „Materiał i metody” Autorka podaje szczegółowe opisy zastosowanych procedur badawczych, podział zwierząt doświadczalnych na grupy oraz schemat doświadczenia. Warto zwrócić uwagę na skrupulatność w sensie dokładności poszczególnych opisów, co czyni zastosowane procedury możliwymi do powtórzenia przez osoby nie biorące udziału w badaniach. Wykorzystane w badaniach metody stanowią połączenie klasycznego warsztatu wirusologicznego, opartego na technikach hodowli komórkowej i zakażeniu zarodków kurzych oraz metod biologii molekularnej, w tym reakcji PCR w czasie rzeczywistym, sekwencjonowania i innych. Niewątpliwie najbardziej interesująca część metodyki dotyczy doświadczenia z reasortacją wirusów grypy ptaków i świń ocenianą *in vivo*. Zastosowanie w tej części badań dodatkowych metod, takich jak test łyśinkowy, pozwoliło na wyselekcjonowanie do dalszych badań pojedynczych izolatów wirusa grypy oraz zbadanie ich sekwencji nukleotydowej i białkowej.

W rozdziale „Wyniki”, podobnie jak w pozostałych, Doktorantka posłużyła się formą opisową oraz graficzną. Dokumentacja wyników badań obejmuje 22 ryciny oraz 5 tabel. Z jednym drobnym zastrzeżeniem dokumentacja pracy jest czytelna. Na podkreślenie zasługuje fakt zamieszczenia w rozdziale „Wyniki” doskonałej jakości elektroforegramów przedstawiających produkty reakcji RT-PCR uzyskiwane na matrycy genów HA i NA wirusów grypy ptaków i świń oraz analizę testu RFLP różnych genów obydwu wirusów.

Wspomniane wcześniej zastrzeżenie odnosi się do rycin na str. 65 i 66, przedstawiających w.c.c. zakażonych loszek oraz knurków. W zaprezentowanej wersji są one bardzo „mozaikowe”, a przedstawione linie łamane w zakresach temperatur o wartościach zbliżonych nakładają się na siebie, co utrudnia odczyt i interpretację wyników tego badania. Pewną pomocą jest natomiast forma opisowa zamieszczona w tekście. Analizując wartości badanego parametru można zaryzykować stwierdzenie, że temperatura ciała jako element oceny klinicznej zwierząt doświadczalnych po zakażeniu eksperymentalnym wirusem grypy ptaków jest istotna, jakkolwiek w całym doświadczeniu nie była najważniejsza. Potwierdzają to uzyskane przez Doktorantkę wyniki, wskazujące na zróżnicowanie wartości w.c.c. w zależności od płci oraz terminu oceny. Przymuszczalnie należało wziąć pod uwagę także indywidualną podatność zwierząt na zakażenie. Podobną uwagę można sformułować w odniesieniu do oceny zmian anatomopatologicznych stwierdzanych u zwierząt doświadczalnych poddawanych eutanazji. Badanie anatomopatologiczne i wirusologiczne, w tym reakcja RRT-PCR wykazały wyraźną zależność pomiędzy nasileniem zmian makroskopowych oraz obecnością materiału genetycznego wirusa grypy ptaków w tkance płucnej i numerem pasażu. W obydwu zestawieniach wyraźną progresję wykazano dopiero począwszy od 19 pasażu *in vivo*.

W badaniach wykazano, że użyty do pasażu szczep ptasi wirusa grypy znacznie łatwiej adaptował się do dolnych dróg oddechowych w porównaniu do górnego odcinka tego układu. Potwierdzeniem tego faktu jest także wyższe miano wirusa wykazane w homogenatach tkanki płucnej w porównaniu do wymazów z błony śluzowej nosa.

Analiza sekwencji nukleotydowej wszystkich, tj. 8 genów wirusa grypy ptaków zaadaptowanego do organizmu świni wykazała, że adaptacja ta pociąga za sobą zmiany w materiale genetycznym zarazka, o czym świadczy wykrycie mutacji punktowych zlokalizowanych we wszystkich genach w ogólnej liczbie 28, skutkujących zmianą sekwencji aminokwasowej syntetyzowanych białek wirusowych, w tym białek wypustek powierzchniowych HA i NA. Szczepy wirusa grypy ptaków pochodzące od świń kontaktowych różniły się tylko nieznacznie od wirusów pochodzących od świń zakażonych. Wykazano u nich tylko 3 różnice aminokwasowe.

W celu oceny występowania zjawiska reasortacji genetycznej u wirusów grypy zwierzęta doświadczalne zakażono równocześnie wirusem grypy ptaków i wirusem grypy świń. W związku z tą częścią badań własnych nasuwa się pytanie, czy w celu oceny zjawiska reasortacji konieczne było wykonywanie badań dodatkowych, takich jak pomiar w.c.c., badanie anatomopatologiczne, reakcja RRT-PCR?

Badania w kierunku wykrycia obecności reasortantów wirusów grypy po koinfekcji z udziałem AIV i SIV wykazały ich pojawienie się tylko w przypadku 3 szczepów wyizolowanych z wymazów błony śluzowej nosa świń, co stanowiło 1,3%. Nie wykazano natomiast żadnego reasortanta pośród 202 szczepów wyizolowanych z próbek homogenatów tkankowych. Warto podkreślić, że w żadnym z wykrytych reasortantów nie wykazano zmiany podtypu, a wymiana materiału genetycznego dotyczyła pojedynczego genu pochodzącego ze szczepu SIV z wyłączeniem genów kodujących HA i NA.

Analizując wszystkie uzyskane wyniki należy podkreślić, że opisane są one bardzo szczegółowo do tego stopnia, że można mieć obawy, czy stwierdzone w badaniach różnice w wartościach badanych parametrów oraz wykazane zależności uda się Doktorantce odpowiednio zinterpretować w oparciu o dostępne w piśmiennictwie wyniki podobnych badań. Nie zmienia to jednak faktu, że wykonane badania mają dużą wartość aplikacyjną, zwłaszcza w kontekście prowadzonych rutynowo badań monitoringowych świń w Polsce w kierunku występowania zakażeń wirusem grypy, w których w teście HI wykorzystuje się tylko antygeny wirusa grypy świń. Tym samym wyklucza się możliwość wykrycia przypadków zakażeń świń powodowanych przez wirusy grypy ptaków. Warto przy tym zaznaczyć, że tego typu infekcje u świń z reguły mają przebieg bezobjawowy, co tym bardziej utrudnia ich rozpoznawanie.

Rozdział „Dyskusja” stanowi przeważnie najtrudniejszą część publikacji naukowej, niezależnie od jej formy. Ideą tego rozdziału jest twórcza analiza wyników badań własnych w konfrontacji z wynikami podobnych badań prowadzonych przez innych autorów. W recenzowanej pracy rozdział ten w większości spełnia te kryteria. Czytając dyskusję można jednak dostrzec także fragmenty mające charakter opracowań monograficznych, mających jedynie luźny związek z badaniami własnymi. Są to przeważnie fragmenty tłumaczeń zaczerpniętych z piśmiennictwa światowego, pozostawione w tekście pracy bez komentarza odnośnie związku cytowanych badań z wynikami badań własnych. Przykładem może być opis występowania różnych wariantów wirusów grypy w populacji trzody chlewnej w różnych krajach świata, jak również analiza mechanizmów reasortacji genetycznej u wirusów grypy. Wydaje się że opisy te, z którymi Doktorantka nie podejmuje żadnej polemiki ani konfrontacji z wynikami badań własnych powinny się znaleźć raczej we wstępie pracy niż w dyskusji. Alternatywnie można z nich zrezygnować bez uszczerbku dla całości pracy. Tym niemniej, zdecydowaną większość hipotez i wyjaśnień sformułowanych w oparciu o wyniki uzyskane w badaniach własnych Autorce udało się obronić i zinterpretować w konfrontacji z danymi piśmiennictwa.

Z przeprowadzonych badań Doktorantka wyciągnęła 8 wniosków. Z założenia powinny one wypływać z badań własnych, powinny być jasne i komunikatywne oraz nie powinny stanowić powtórzenia już wcześniej opisanych wyników. Ich lektura skłania recenzenta do zwrócenia uwagi na możliwość przeredagowania niektórych wniosków, tak aby nie budziły wątpliwości. Wnioski 1, 5, 6 i 8 zostały sformułowane prawidłowo. Wniosek 2 jest niejasny w swej treści. Nie wiadomo jak należy rozumieć użyte określenia „proces złożony i długotrwały”. Wniosek 3 ze względu na odniesienie do procesu adaptacji wirusa grypy ptaków do organizmu świni można połączyć z wnioskiem 2 po jego modyfikacji, ewentualnie zrezygnować z wniosku 2. Wniosek 4 w zaprezentowanej formule słownej stanowi przypuszczenie, a nie jednoznaczne stwierdzenie. Wniosek 7 tylko częściowo wynika

z przeprowadzonych badań własnych. Po części wiąże się on natomiast z wynikami uzyskiwanymi przez innych autorów. Doktorantka nie wykonywała doświadczenia nad reasortacją genetyczną z udziałem szczepów wysoce kompatybilnych pod względem molekularnym, tj. cechujących się wysokim stopniem pokrewieństwa fenotypowego i genotypowego.

Uwagi redakcyjne

Praca napisana jest poprawnym językiem, dlatego czyta się ją łatwo i chętnie. Można zaryzykować stwierdzenie, że Autorka ma „lekką rękę” do pisania lub szczęście do wnikliwego i skrupulatnego promotora pomagającego skorygować ewentualne niedociągnięcia. Zapewne po części obie tezy są słuszne. Odczucie recenzenta, że niektóre zawarte w tekście sformułowania można by zmodyfikować czyniąc je bardziej komunikatywnymi może być subiektywne i nie musi być zasadne.

W tekstach, nie tylko naukowych, nie da się uniknąć drobnych błędów literowych. One nie mają jednak żadnego wpływu na wartość pracy. Zważywszy, że poszczególne części rozprawy doktorskiej przedłożonej do oceny w formie oprawionego wydruku komputerowego przed oddaniem do publikacji w czasopismach naukowych będą poddawane ponownej weryfikacji i redakcji wspomniane błędy literowe można będzie skorygować. Pozwolę sobie zatem przedstawić tylko te uwagi, które mają charakter polemiczny i które w moim przekonaniu ułatwią Doktorantce przygotowanie ostatecznej wersji tekstu do opublikowania.

Str. 21. Doktorantka pisze, że „białka HA i NA wykazują antagonistyczne działanie”. Nie jest to do końca prawdą. Zresztą Autorka sama podaje w kolejnym zdaniu, że role obydwu białek są komplementarne. Dosłownie pojmowany antagonizm nie pozwoliłby wirusowi na funkcjonowanie w sensie zakażenia komórki oraz replikacji ponieważ w ogóle nie dochodziłoby do wnikięcia zarazka do komórki gospodarza. Prawdą jest natomiast stwierdzenie, że prawidłowe funkcjonowanie wirusa wymaga odpowiedniej aktywności obydwu białek.

Str. 24. Doktorantka pisze, że „białko M1 kodowane przez segment 7 wytwarza tzw. strukturę nadcząsteczkową głównie z udziałem C-terminalnej domeny tego białka”. Wyjaśnienia wymaga o jaką strukturę chodzi oraz jaka jest ewentualnie jej funkcja.

Niektóre sformułowania zawarte w pracy, jakkolwiek prawdziwe, pozostają trudnymi do zrozumienia ze względu na stosowanie wysoce specjalistycznej terminologii. Przykładem może być zdanie ze strony 24, cyt. „Monomer M2 posiada 24-aminokwasową N-kończącą ektodomenę, alfa-helikálną część transbłonową i 50-aminokwasową endodomenę, stanowiącą amfipatyczną alfa-helisę”. Na przykładzie tego zdania można sformułować wniosek, że w przypadku tłumaczeń stwierdzeń zaczerpniętych z opracowań anglojęzycznych należy zwracać uwagę na ich komunikatywność w wersji polskojęzycznej.

W kilku miejscach w pracy, m.in. na str. 30, pojawia się określenie „wirus zaadoptowany” w znaczeniu „przystosowany” zamiast prawidłowej formy „zaadaptowany”. Różnica pomiędzy adopcją i adaptacją jest zasadnicza, zatem powinno się używać formy właściwej.

Str. 36. Rozdział 3. Uzasadnienie i cele pracy. Ponieważ *de facto* rozdział został podzielony na dwie części, tj. uzasadnienie oraz cele pracy, konsekwencją powinno być odpowiednie dopasowanie numeracji podrozdziałów. W efekcie podrozdział „Cele pracy” nie został opatrzony numerem.

Str. 67. Uwaga dotyczy opisu zmian anatomopatologicznych. Doktorantka używa określenia „zmiany w płatach były duże i wyraźnie widoczne”. Określenie to jest

nieprecyzyjne i zabarwione subiektywizmem, ale jako usprawiedliwienie można przyjąć fakt, że Autorka nie jest lekarzem weterynarii.

Str. 68 i str. 80, pkt. 5.1.5. i 5.2.4. Tytuły podrozdziałów brzmią „Wykrywanie RNA wirusa grypy testem PCR w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją w materiale biologicznym”. Proponuję umieścić wyrazy „w materiale biologicznym” po słowach „wirusa grypy”.

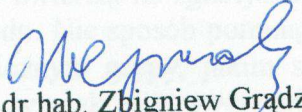
Str. 74. Skróty myślowe typu „Do sekwencjonowania wybrano próbkę tchawicy knurka z pasażu 8 i 15” – chodzi o wirusa izolowanego z próbki tchawicy ...; oraz „z pasażu 19 wybrano nabłonek błony śluzowej nosa i płat środkowy płuca prawego...” powinno się skorygować.

Str. 104. „Zdolność do replikacji i transmisji w systemach „ssaczyc”, czy w systemach ssaków? Chyba drugie określenie jest bardziej poprawne.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Urbaniak pt. „Replikacja wirusa grypy ptaków w organizmie świni” stanowi opracowanie w pełni oryginalne i wnoszące nowe dane do obszaru wiedzy z zakresu epidemiologii grypy, w tym zwłaszcza w odniesieniu do udziału świń w międzygatunkowej transmisji wirusów grypy ptaków. Praca odpowiada warunkom określonym w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i na tej podstawie przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wnioski o dopuszczenie Pani mgr Kingi Urbaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę aktualność problematyki podejmowanej w recenzowanej dysertacji, nowoczesny warsztat badawczy, staranność jej wykonania oraz wysoki nakład pracy wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Lublin, 18 sierpnia 2015 r.


Prof. dr hab. Zbigniew Grządki