

Olsztyn, 28.09.2018 r.

dr hab. Aleksandra Platt-Samoraj prof. nadzw. UWM
Katedra Epizootiologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

OCENA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Anny Marzec-Grządziel** pt. „**Wpływ inhibitorów TNF- α , IL-6 i MAPKs na przeżywalność oraz przebieg procesów zapalnych u myszy zakażonych wirusem wścieklizny**” wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. Marcina Smreczka, prof. nadzw. w Zakładzie Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach prof. dr hab. Dariusza Bednarka z dnia 31.08.2018r. powołujące się na uchwałę Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 27.04.2016 r.

Wścieklizna jest jedną z najstarszych znanych ludzkości chorób zakaźnych. Wspomina już o niej kodeks Hammurabiego z XVII w. p.n.e. Jest też jedną z najstarszych chorób, z którymi rozpoczęto planową walkę. Przyczyną wścieklizny jest niezwykle, neurotropowy wirus należący do rodziny *Rhabdoviridae*, rodzaju *Lyssavirus*, którego właściwości, mimo wielu lat badań, dotychczas do końca nie poznano. Nie poznano też ostatecznie patogenezę choroby i sposobów jej leczenia. Ciągłe pojawiają się nowe zdarzenia nie mieszczące się w ramach dotychczasowych poglądów, dlatego też wścieklizna nadal się szerzy. Wprawdzie zostały opracowane skuteczne szczepionki profilaktyczne i post-ekspozycyjne, lecz jeśli dojdzie do rozwinięcia się klinicznej postaci choroby u człowieka, to jej przebieg jest dramatyczny i zawsze, poza nielicznymi wyjątkami, kończy się śmiercią. Uderzający jest kontrast pomiędzy skąpych zmianami anatomo-patologicznymi i histopatologicznymi a niezwykle ciężkimi objawami klinicznymi. Nie ustalono do końca jakie sygnały wysyła wirus podczas infekcji, że doprowadza do tak ciężkiego spustoszenia organizmu. Nie udało się również wytłumaczyć ostatecznie, dlaczego chorzy na wściekliznę

umierają. Wyjaśnienie tych kwestii jest niezbędne do opracowania skutecznych metod leczenia choroby. Zatem, podjęcie przez lek. wet. Annę Marzec-Grządziel badań nad wpływem nadmiernej odpowiedzi immunologicznej wrodzonej rozwijającej się w wyniku zakażenia wirusem wścieklizny na przebieg choroby i śmierć zaatakowanego organizmu jest w pełni uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 105 stron. Składa się z 11 rozdziałów, takich jak: Wstęp, Cel i uzasadnienie pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Spis rycin. Spis tabel, Streszczenie w języku polskim i Streszczenie w języku angielskim oraz Piśmiennictwo. Dysertacja zawiera 17 rycin i 12 tabel.

We wstępie poprzedzonym wykazem stosowanych skrótów, podzielonym na 5 rozdziałów i 9 podrozdziałów, obejmującym 16 stron, Doktorantka szczegółowo przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat cyklu życiowego wirusa wścieklizny (RABV), budowy wirionu, procesów immunologicznych zachodzących w przebiegu zakażenia oraz patogenezy zakażeń szczepami atenuowanymi, laboratoryjnymi i terenowymi RABV. W ostatnim podrozdziale wstępu zostały opisane próby poszukiwania sposobów leczenia wścieklizny.

Wstęp dowodzi bardzo dobrej znajomości badanej problematyki oraz piśmiennictwa związanego z obszarem podjętych badań. Opracowane przez Doktorantkę bardzo interesujące kolorowe ryciny w dużej mierze ułatwiają zrozumienie opisanego materiału. Szkoda tylko, że niektóre napisy zawarte w ilustracjach mają tak małą czcionkę, że z trudem udaje się je odczytać.

RABV w przebiegu zakażenia unika odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu, jednocześnie intensywnie pobudza procesy związane z odpowiedzią immunologiczną wrodzoną. Według przyjętej hipotezy to właśnie nadekspresja chemokin w przebiegu zakażenia RABV jest odpowiedzialna za większość objawów wścieklizny i śmierć gospodarza.

W rozdziale zatytułowanym „Cel pracy” przedstawiony został jeden główny cel, którym była weryfikacja hipotezy zakładającej, że zastosowanie inhibitorów wybranych aktywatorów szlaków przekazywania sygnału w czasie zakażenia wirusowego, takich jak inhibitory TNF- α , IL-6 i MAPK, ograniczy odpowiedź immunologiczną wrodzoną i wydłuży przeżywalność zwierząt doświadczalnych pozwalając na wytworzenie przeciwciał anty-RABV. W tym celu postanowiono (*) porównać czas przeżywalności zwierząt w grupach doświadczalnych, w których myszom zakażonym RABV podawano poszczególne inhibitory szlaków immunologicznych w odniesieniu do grupy kontrolnej, (**) przeprowadzić analizę miana i liczby kopii genu *N* wirusa wścieklizny w OUN myszy, którym podawano inhibitory

szlaków immunologicznych po zakażeniu RABV oraz myszy z grupy kontrolnej (zakażonych RABV), oraz (***) zbadać ekspresję genów dla wybranych markerów odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie RABV oraz markerów śmierci komórkowej w poszczególnych grupach doświadczalnych.

W rozdziale „Materiał i metody”, liczącym 15 stron i zawierającym 10 podrozdziałów, Doktorantka scharakteryzowała wykorzystany w doświadczeniu model zwierzęcy, zasady randomizacji, użyty w zakażeniu szczep wirusa oraz wybrane inhibitory cytokin i kinaz. Następnie opisała schemat doświadczenia, pobierania próbek do badań, zasady określania miana i ilości wirusa w badanych próbkach oraz metody określania ekspresji wybranych genów wrodzonego układu immunologicznego. Rozdział kończy dokładny opis metod wykorzystanych do analizy statystycznej.

Badania przeprowadzono na 66 myszach laboratoryjnych podzielonych losowo na 7 grup doświadczalnych, gdzie w trzech grupach podano wirus oraz poszczególne inhibitory szlaków immunologicznych, w jednej, stanowiącej grupę kontrolną, podano jedynie wirus wścieklizny oraz trzech kontrolnych grupach podano wyłącznie inhibitory szlaków immunologicznych.

Dobór użytych technik badawczych jest uzasadniony i prawidłowo koreluje z założonym celem pracy. Na wysoką ocenę zasługuje zastosowanie w badaniach nowoczesnych technik molekularnych do określania liczby kopii wirusa i ekspresji genów, a ich szczegółowe opisy świadczą o bardzo dobrym opanowaniu technik badawczych Doktorantki.

Bardzo dobrym pomysłem było przedstawienie dość zawilej charakterystyki grup doświadczalnych i schematu planu doświadczalnego w tabeli i za pomocą ryciny. Dla łatwiejszego zrozumienia ich treści warto byłoby umieścić, zarówno pod tabelą, jak i ryciną, legendę zawierającą zastosowane w nich skróty. Według informacji zawartej w tabeli 1 dwie grupy doświadczalne, w których podawano inhibitory TNF- α i IL-6 zawierały po 10 myszy zakażonych wirusem wścieklizny, natomiast grupa, w której podawano inhibitory MAPK złożona była z 20 zwierząt. Dobrze by było wyjaśnić w dyskusji powody tych różnic.

Do zakażenia doświadczalnego myszy wykorzystano szczep SHBRV-18 wyizolowany z przypadku wścieklizny u człowieka pogryzionego przez nietoperza. W pracy nie pojawiła się informacja na temat genotypu tego szczepu. Jest to istotne, ponieważ istnieją sugestie, że genotypy „nietoperzowe” wirusa wścieklizny mogą powodować nieco inne zmiany w OUN zakażonego organizmu niż należący do genotypu 1 klasyczny wirus wścieklizny.

Wyniki zostały przedstawione na 21 stronach w formie opisowej i graficznej. Rozdział złożony z pięciu podrozdziałów zawiera 7 rycin i 6 tabel, obejmuje obszerny i szczegółowy opis uzyskanych wyników badań. Starannie wykonane diagramy w sposób przejrzysty obrazują rezultaty doświadczenia. Rozdział obejmuje wyniki analizy przeżywalności, miana SHBRV-18 i liczbę kopii genu *N* SHBRV-18 w grupach doświadczalnych oraz poziomy ekspresji mRNA wybranych markerów genetycznych w OUN zwierząt doświadczalnych.

Wyniki badań, poddane wielokierunkowej analizie statystycznej również zostały w sposób jasny przedstawione na diagramach oraz w tabelach. Rezultaty badań zostały przedstawione zgodnie z założonymi celami pracy i wnoszą nowe wartości do obecnego stanu wiedzy na temat procesów patogenetycznych w przebiegu zakażenia wirusem wścieklizny.

Otrzymane wyniki uważam za bardzo interesujące. Lek. wet. Anna Marzec-Grządziel wykazała między innymi, że najdłuższy czas przeżycia osiągnięto w grupie, która otrzymywała inhibitor TNF- α . Najwyższe miana wirusa oraz największą liczbę kopii genu *N* SHBRV-18 stwierdzano w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego, co moim zdaniem jest bardzo istotne, biorąc pod uwagę materiał pobierany do badań w rutynowej diagnostyce wścieklizny, gdzie badane są fragmenty mózgowia.

Mocną stroną dysertacji jest liczący 16 stron rozdział „Dyskusja”, który zawiera analizę wyników badań własnych w konfrontacji z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Doktorantka w rozdziale tym dowiodła umiejętności prowadzenia naukowej polemiki a odpowiednio dobrane piśmiennictwo świadczy o znajomości badanej problematyki.

Rozprawę kończą trzy wnioski opracowane na podstawie uzyskanych wyników. W oparciu o zaprezentowany schemat badań doświadczalnych oraz opisaną wcześniej metodykę lek. wet. Anna Marzec-Grządziel wykazała, że zastosowanie inhibitorów TNF- α , IL-6 oraz MAPK spowodowało wydłużenie czasu przeżycia zwierząt poprzez ograniczenie nadmiernej reakcji układu immunologicznego organizmu gospodarza w odpowiedzi na zakażenie SHBRV-18 najwyraźniej zaznaczone w grupie, w której zastosowano inhibitor TNF- α . Doktorantka wykazała też brak wpływu inhibitorów szlaku immunologicznego na intensywność namnażania wirusa oraz brak znaczenia apoptozy w przebiegu zakażenia szczepem SHBRV-18.

Na końcu rozprawy umieszczono spis rycin, tabel oraz streszczenia w językach polskim i angielskim oraz liczącą 180 pozycji listę cytowanych w pracy artykułów. Należy podkreślić, że dysertacja została napisana bardzo starannie, piękną polszczyzną, w sposób

przejrzysty, mimo dość skomplikowanego schematu doświadczalnego i niełatwego tematu badawczego, którego podjęła się Doktorantka.

Podsumowując, należy stwierdzić, że wykonane przez lek. wet. Annę Marzec-Grządziel obszerne i pracochłonne badania dostarczyły ciekawych i cennych wyników poznawczych oraz aplikacyjnych, zasługujących na wysoką ocenę. Zawarte w recenzji uwagi mają w większości charakter porządkowy lub dyskusyjny i nie wpływają na wysoką ocenę recenzowanej rozprawy doktorskiej. Niewątpliwie jednym z cenniejszych aspektów pracy jest wzbogacenie wiedzy na temat procesów patogenetycznych wścieklizny. Uzyskane przez lek. wet. Anna Marzec-Grządziel rezultaty badań mogą przyczynić się do opracowania skutecznej terapii klinicznej postaci wścieklizny.

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Anny Marzec-Grządziel pt. „Wpływ inhibitorów TNF- α , IL-6 i MAPKs na przeżywalność oraz przebieg procesów zapalnych u myszy zakażonych wirusem wścieklizny” 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 oraz warunkom określonym w § 6. Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego-Państwowego Instytutu Badawczego wnioski o dopuszczenie lek. wet. Anna Marzec-Grządziel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę też o wyróżnienie pracy, ponieważ uważam, że rozprawa doktorska lek. wet. Anna Marzec-Grządziel w sposób znaczący wzbogaca wiedzę na temat patogenezы i potencjalnych metod leczenia wścieklizny.

Olsztyn, 28.09.2018 r.

