

Olsztyn, 29.10.2018 r.

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

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr **Darii Reczyńskiej** pt. „**Ekspresja białek ostrej fazy i katelicydyn w komórkach krwi i mleka kóz mlecznych w odpowiedzi na zakażenie lentiwirusem małych przeżuwaczy (SRLV)**”

wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Emilii Bagnickiej
w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu.

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo Dyrektora Instytutu prof. dr hab. Jarosława Horbańczuka z dnia 29.09.2015 r. powołujące się na uchwałę Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu z dnia 15.11.2017 r.

Jedną z najważniejszych chorób zakaźnych kóz w Polsce jest obecnie podlegające obowiązkowi rejestracji zapalenie stawów i mózgu kóz (CAE). Ta lentiwirusowa choroba o charakterze przewlekłym, będąca przyczyną strat ekonomicznych wynikających ze spadku wydajności mlecznej oraz konieczności eliminacji wyniszczonych chorobą zwierząt, stanowi jedno z największych wyzwań w hodowli kóz. Wielopostaciowość CAE sprawia wrażenie występowania w stadzie wielu różnych schorzeń, a zdolność wywoływania przez lentiwirus małych przeżuwaczy (SRLV) zakażeń latentnych utrudnia w dużym stopniu uwolnienie stada od czynnika etiologicznego na podstawie wyników badań serologicznych, które są proceduralną metodą rozpoznawania CAE. Wiedza na temat czynnika etiologicznego wciąż jest niepełna. Przede wszystkim nie została do końca wyjaśniona patogeneza choroby, a w tym procesy immunologiczne występujące w przebiegu zakażenia. Głównie z tego powodu dotychczas nie opracowano skutecznych metod zwalczania choroby, a właściwości wirusa uniemożliwiają skonstruowanie efektywnej szczepionki. Dlatego tak ważne jest dokładne poznanie wszystkich mechanizmów immunologicznych towarzyszących zakażeniu SRLV, także reakcji niespecyficznych, jak mechanizmy odporności wrodzonej. Zatem podjęcie przez mgr Darię Reczyńską badań nad ekspresją genów kontrolujących produkcję białek ostrej fazy u kóz zakażonych SRLV uważam za uzasadnione.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, o układzie nieco odmiennym niż tego rodzaju opracowania, liczy 127 stron. Składa się z 12 rozdziałów, takich jak Wykaz skrótów, Wstęp, Hipotezy badawcze, Cel badań, Przegląd piśmiennictwa, Materiał i metody, Wyniki i dyskusja, Podsumowanie, Wnioski, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Bibliografia oraz Netografia. Dysertacja zawiera 31 wykresów i 6 tabel.

W liczącym 2 strony wstępie, poprzedzonym wykazem stosowanych skrótów, Doktorantka zawarła informacje na temat światowej i polskiej populacji kóz, trendów hodowlanych oraz problemów w hodowli związanych z pojawieniem się SRLV. Przedstawiła też trudności związane z diagnozowaniem i eliminacją zakażeń.

W rozdziale „Hipotezy badawcze” Autorka w dwóch zdaniach przedstawiła założenia, zgodnie z którymi zakażenie SRLV ma wpływ, poprzez układ immunologiczny, na ekspresję genów kontrolujących produkcję białek ostrej fazy (BOF) i katelicydyn oraz na profil ekspresji genów kodujących mikro RNA (miRNA), czego odbiciem ma być poziom BOF w mleku i surowicy. Celem badań była obrona założeń hipotezy badawczej.

W rozdziale „Przegląd piśmiennictwa”, zawierającym trzy podrozdziały, została przedstawiona taksonomia i budowa SRLV oraz patogenezę, przebieg, diagnostyka i metody zwalczania CAE. Został też opisany przebieg reakcji ostrej fazy oraz charakterystyka i mechanizm działania BOF mających znaczenie w przebiegu procesów patofizjologicznych u kóz, takich jak: amyloid surowiczy (SAA), haptoglobina (Hp), ceruloplazmina (Cp), kwaśna alfa-1-glikoproteina (AGP), fibrynogen (Fb), alfa-laktoglobulina (LALBA), białko C-reaktywne (CRP). W osobnych podrozdziałach przedstawiono charakterystykę katelicydyn oraz regulacje epigenetyczne.

W rozdziale „Materiał i metody”, zawierającym 16 stron, złożonym z dwóch podrozdziałów, Doktorantka scharakteryzowała grupy eksperymentalne zwierząt wykorzystanych w doświadczeniu, wykonywane badania mikrobiologiczne oraz fizykochemiczne mleka, badania molekularne i immunoenzymatyczne mleka i surowicy oraz zastosowane do ewaluacji wyników analizy statystyczne.

Przedstawione badania zostały przeprowadzone w dwóch grupach kóz mlecznych, które składały się z 12 kóz określonych na podstawie badań serologicznych jako zakażone SRLV oraz 12 kóz serologicznie ujemnych.

Badania bakteriologiczne mleka zostały wykonane, jak napisała Doktorantka, „w celu wykluczenia wpływu obecności bakterii patogennych”. Szkoda, że w tym miejscu nie znalazła się informacja w kierunku obecności których bakterii przeprowadzono badania oraz ile dokładnie próbek mleka poddano badaniom bakteriologicznym.

Materiał do badań molekularnych stanowiły komórki somatyczne wyizolowane z mleka oraz leukocyty krwi, w których metodą real-time PCR badano ekspresję genów kontrolujących BOF oraz genów kodujących miRNA regulujących ekspresję genów kodujących BOF. Łącznie przeprowadzono badania 480 próbek mleka i 240 próbek krwi.

Na uznanie zasługuje zastosowanie wysoko specjalistycznych metod molekularnych, takich jak real time PCR, do badania ekspresji genów oraz mechanizmów regulacji ekspresji poprzez geny dla miRNA.

Rozdział „Wyniki i dyskusja” składa się z 4 podrozdziałów, w których Doktorantka przedstawiła rezultaty badań mikrobiologicznych i parametrów fizykochemicznych mleka, badań ekspresji genów kodujących BOF i katelicydyny, poziomy BOF w mleku i surowicy oraz ekspresji genów miRNA. W poszczególnych podrozdziałach dokonano porównania wyników uzyskanych od zwierząt zakażonych SRLV i SRLV- negatywnych w konfrontacji do wyników uzyskanych przez innych badaczy. Uzyskane rezultaty, przedstawione w formie opisowej i graficznej, są interesujące i wnoszą nowe wartości do obecnego stanu wiedzy na temat reakcji ostrej fazy w przebiegu CAE. Badania wykazały brak wpływu zakażenia SRLV u kóz na zanieczyszczenie mikrobiologiczne mleka, zarówno bakteriami środowiskowymi, jak i chorobotwórczymi oraz na procentową zawartość tłuszczu, kazein, laktozy, kwasu cytrynowego i mocznika w mleku. Nie wykazano też wpływu zakażenia na większość badanych parametrów fizyko-chemicznych mleka ani na ekspresję genów BOF i katelicydyn.

Wykazano natomiast większą liczbę komórek somatycznych w mleku, niższą zawartość suchej masy i suchej masy beztłuszczowej u kóz zakażonych. Stwierdzono też wyższy poziom transkryptów genów Hp i SAA w leukocytach. U kóz zakażonych SRLV stwierdzono jednocześnie spadek stężenia SAA, Cp i katelicyny MAP28 oraz wzrost MAP34 w mleku, a w surowicy wzrost stężenia SAA.

Pewną trudność stanowiła interpretacja opisanych wyników badań bakteriologicznych. Autorka podała wyłącznie wartości procentowe próbek mleka zanieczyszczonych bakteriami, przy czym powoływała się w dyskusji na wynik badań innych autorów, gdzie oprócz procentowej wartości podano liczbę badanych próbek. Kolorowe wykresy nieco ułatwiły interpretację rezultatów, chociaż również zawierały wyłącznie wartości procentowe.

Rozdział „Podsumowanie” zawiera ujęte w dziewięciu punktach rezultaty badań.

Recenzowaną pracę doktorską wieńczy sześć wniosków, streszczenia w językach polskim i angielskim oraz wykaz 169 pozycji piśmiennictwa i 8 pozycji netograficznych dowodzących umiejętności doboru literatury odpowiedniej do analizy i dyskusji uzyskanych wyników badań własnych.

Reasumując, należy stwierdzić, że wykonane przez Doktorantkę obszerne i pracochłonne badania dostarczyły ciekawych i cennych wyników poznawczych oraz aplikacyjnych, zasługujących na pozytywną ocenę. Mgr Daria Reczyńska wykazała, że zakażenie kóz SRLV nie wpływa na wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję większości badanych BOF, oraz że białka uważane za istotne wskaźniki reakcji ostrej fazy u kóz, takie jak SAA, Hp i Cp mają niewielkie znaczenie w przypadku zakażenia SRLV. Wykazała też, że procesy regulacji genetycznej mierzone poziomem ekspresji miR były wyraźniej zaznaczone w komórkach somatycznych w mleku, niż w leukocytach krwi obwodowej, oraz że wyższe stężenie SAA we krwi, przy jednoczesnym stałym stężeniu innych BOF oraz spadku stężenia SAA i Cp w mleku może służyć jako dodatkowy wskaźnik diagnostyczny zakażenia SRLV u kóz, co ma istotne znaczenie aplikacyjne. Na wysoką ocenę zasługuje również staranna analiza statystyczna wyników.

Szczegółowa analiza rozprawy ujawniła jednak kilka nieścisłości i błędów, których autorka nie ustrzegła się przygotowując ostateczną wersję rozprawy, zatem jako recenzent zobowiązana jestem je przedstawić w formie uwag krytycznych.

- Wykaz skrótów zamieszczony na początku pracy jest bardzo przydatny, niestety, nie zawiera wyjaśnień wszystkich stosowanych w pracy skrótów. Zabrakło m. in.:
 - AGID – odczyn immunodifuzji w żelu agarowym, str. 16
 - BIV - bydlęcy wirus niedoboru odporności (bovine immunodeficiency virus), str. 14
 - BRSV – wirus syncytialny układu oddechowego bydła (bovine respiratory syncytial virus), str. 31
 - COX 2 – cyklooksigenaza-2, str. 32
 - DENZ – wirus denga (dengue virus), str. 31
 - dUTPase – deoksyurydynopirofosfataza, str. 15
 - EIAV – wirus niedokrwistości zakaźnej koni (equine infectious anemia virus), str. 14
 - ELISA – test immunoenzymatyczny (enzyme-linked immunosorbent assay), str. 16, 17, 34, 36, 44, 108, 111

- EMT - przejście epithelialno-mezenchymalne (epithelial – mesenchymal transition), str. 95
- FAWC – Rada Dobrostanu Zwierząt Gospodarskich (Farm Animal Welfare Committee), str. 11
- GSM – błona maziowa, str. 74
- HDL – lipoproteina o wysokiej gęstości (high density lipoprotein), str. 21
- HIV – ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus), str. 11, 14, 27, 73, 86, 94, 95, 1001, 104
- HPV – wirus brodawczaka ludzkiego (human papillomavirus), str. 31, 32
- IN – integraza, str. 15
- LDL – lipoproteina o niskiej gęstości (low density lipoprotein), str. 21, 22, 36
- LKS – liczba komórek somatycznych, str. 36, 45, 55, 91
- lnLKS – logarytm z liczby komórek somatycznych, str. 45, 55
- LTRs – długie końcowe powtórzenia sekwencji (long terminal repeats), str. 14
- NGF – czynnik wzrostu nerwów (nerves growth factor), str. 30
- OPP – Postępowe zapalenie płuc owiec (ovine progressive pneumonia), str. 10
- PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (peripheral mononuclear blood cells), str. 15
- PC – fosfocholina, str. 25
- PGE2 – prostaglandyna E2, str. 34, 35
- PR – proteaza, str. 15
- PRRSV – wirus zespołu rozrodczo oddechowego świń (porcine reproductive and respiratory syndrom virus), str. 31
- PTX – pentraxyna, str. 25
- RIPA – radioimmunoprecypitacja (radioimmunoprecypitation), str. 16
- RISC – kompleks wyciszający RNA (RNA-induced silencing complex), str. 29
- RT – odwrotna transkrypcja (reverse transcription), str. 16
- RZS – reumatoidalne zapalenie stawów, str. 30
- SAM-s - adenozyłometionina-s, str. 28
- SARS- CoV – koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (severe acute respiratory syndrome coronavirus), str. 31, 94
- SD – odchylenie standardowe (standard deviation), str. 54
- SE – błąd standardowy (standard error), str. 54 – 57, 60 - 63, 66 – 69, 76, 78, 82 – 84, 87 – 89, 97 – 100
- SNIP – brodawczak nosowo-zatokowy odwrócony (sinonasal inverted papilloma), str. 31, 32
- SU – białko powierzchniowe (surface protein), str. 15
- TGF-β2 – transformujący czynnik wzrostu β2 (transforming growth factor), str. 34, 35
- TLKA – tropiomiozynowy receptor kinazy A, str. 30
- TM – białko transbłonowe (transmembrane protein), str. 15
- VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (vascular endothelial growth factor), str. 30, 95
- VLDL – lipoproteina o bardzo niskiej gęstości (very low density lipoprotein), str. 21

- VSV – wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (vesicular stomatitis virus), str. 30, 95
 - WB – western blotting
- jednocześnie brak w tekście wyjaśnienia zastosowanych skrótów: str. 19, 24 – komórki NK, str. 21 - HDL, str. 22 - SCF, str. 26 – LDL, str. 29 – RAN, str. 27, 31 - HSV, str. 31 - WSN, str.32 – DNMT, str. 34 – system INRA
- W rozdziale „Netografia” brak <http://www.genecards.org/>- pozycja cytowana na str. 44.
- W całej pracy Doktorantka pisze o „komórkach somatycznych mleka”. Mleko to wydzielina, nie tkanka, nie składa się z komórek. Komórki somatyczne pochodzą z nabłonka kanalików mlekowych i z krwi. Prawdłowo stosuje się określenie „komórki somatyczne w mleku”.
- Podobnie, Doktorantka często używa określenia „ekspresja białek”. Ekspresji ulegają geny, białka raczej sekrecji.
- Wydaje mi się, że gdyby „Cel badań” został ujęty w punktach zamiast w jednym bardzo długim zdaniu byłby mniej zawiły.
- Str. 21 – „izoforny genu kodującego SAA” - izoforny to struktury białek. Powinno być geny kodujące izoforny SAA.
- W całej pracy Doktorantka zamiennie używa określenia próby i próbki. Prawdłowo do badań pobierane są próbki, natomiast „próba”, to zbiór obserwacji statystycznych, lub czynność (test, eksperyment).
- Tytuły wykresów 12-23 powinny zawierać informacje na temat metody badania przedstawionych parametrów, a na osi rzędnych powinny być podane odpowiednie jednostki.
- Tabele 5 i 6 wykonane na podstawie bazy genów docelowych ustalonych dla ludzkiego genomu”, które zostały zamieszczone na stronach 92 i 93 oraz 102 -103 w rozdziale „Wyniki i dyskusja” powinna się znaleźć w rozdziale „Przegląd piśmiennictwa”, ponieważ nie zawierają wyników pracy Autorki.

W pracy znalazło się też kilka nieścisłości i niezręcznych sformułowań:

- Str. 31 - „miR-214 jest (...) celem terapeutycznym dla brodawczaka” – to raczej brodawczaki są celem terapeutycznym.
- W rozdziale „Wyniki i dyskusja znajduje się podrozdział 7.3.1 zatytułowany „Ekspresja genów białek ostrej fazy i katelicydyn na poziomie mRNA i białka pomiędzy tkankami”. Sugeruje to istnienie jakiejś nowej formy białka, zatem tytuł powinien być inaczej sformułowany.
- Proponuję również zmianę tytułu podrozdziału 7.3.2 „Ekspresja białek ostrej fazy i katelicydyn na poziomie mRNA i białka między zwierzętami wolnymi od zakażenia i zakażonymi SRLV” na „Ekspresja białek ostrej fazy i katelicydyn na poziomie mRNA i białka u zwierząt wolnych od zakażenia i zakażonych SRLV”.
- W powyższym rozdziale, na str. 72 znalazła się informacja, że SRLV „... mogą kontrolować układ odpornościowy gospodarza”. Wątpliwe aby wirus mógł przejąć kontrolę nad układem immunologicznym gospodarza, a z pewnością dowodem tego nie może być zdolność unikania odpowiedzi immunologicznej, jak sugeruje Doktorantka. Nie jest też „niewidoczny dla układu odpornościowego”, skoro u

zakażonych zwierząt stwierdzone są przeciwciała anty-SRLV. W końcu na tej podstawie Doktorantka utworzyła jedną z grup doświadczalnych.

- Radziłabym unikać twierdzenia, że przedstawione badania dotyczą ekspresji BOF i katelicydyn u małych przeżuwaczy **w odpowiedzi na zakażenie SRLV**, ponieważ doświadczenie nie dotyczyło eksperymentalnego zakażenia kóz. Praca miała na celu porównanie pewnych parametrów u kóz zakażonych i niezakażonych. Badane zwierzęta uległy zakażeniu w różnym czasie, były zróżnicowane wiekowo oraz narażone na różne okoliczności dodatkowo wpływające na poziomy BOF.
- Str. 86 – Sugeruję zmianę „W badaniach nad ekspresją cytokin...” na „W badaniach nad ekspresją genów kontrolujących produkcję cytokin”.
- Str. 94 - Autorka napisała, że „Niższy poziom ekspresji w WBC zwierząt zakażonych może świadczyć, że SRLV ma zdolność do wyciszania ekspresji genu miR-214.”. To miRNA wycisza geny w odpowiedzi na zakażenie wirusem.
- Wniosek 3 uważam za zbyt śmiały. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania dotyczą jedynie reakcji ostrej fazy i uzyskane wyniki nie dają podstawy do stwierdzenia, że „lokalna odpowiedź immunologiczna gruczołu sutkowego jest niezależna i odmienna od odpowiedzi całego organizmu”.

Uwagi dotyczące wykazu piśmiennictwa:

- W wykazie brakuje 8 pozycji, na które Autorka powołuje się w rozprawie:
Brenaut i wsp., 2014, str. 45, Blacklaws, 1995, str. 72, Dong i wsp., 2013 str. 43, Finot i wsp., 2011, str. 43, Holmberg i Laurell, 1948, str. 23, Restelli i wsp., 2014, str. 43, Shamove i wsp., 1999, str. 43, Thomson i wsp., 2013
- W wykazie piśmiennictwa znajduje się pozycja nie cytowana w pracy : Leitner i wsp., 2011

Przedstawione uwagi krytyczne, mające w większości charakter dyskusyjny, porządkowy nie umniejszają w znaczący sposób wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej i nie mają fundamentalnego wpływu na jej pozytywną ocenę.

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Darii Reczyńskiej pt. **„Ekspresja białek ostrej fazy i katelicydyn w komórkach krwi i mleka kóz mlecznych w odpowiedzi na zakażenie lentiwirusem małych przeżuwaczy (SRLV)”** 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 Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu wniosek o dopuszczenie mgr Darii Reczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, 29. 10. 2018 r.