

**Recenzja pracy 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 prof. dr hab. Emilii Bagnickiej – promotora  
oraz dr. Michała Czopowicza – promotora pomocniczego  
w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu

Przedłożona praca doktorska dotyczy badań określenia wpływu zakażenia lentiwirusem małych przeżuwaczy – SRLV kóz mlecznych na ekspresję genów białek ostrej fazy oraz katelicydyn, których wyniki częściowo zostały opublikowane w dwóch artykułach naukowych.

Występowanie chorób u zwierząt może powodować poważne straty ekonomiczne w hodowli zwierząt gospodarskich, dlatego badania związane z diagnostyką chorób i rozwojem metod ich zwalczania ciągle cieszą się dużym zainteresowaniem. W hodowli owiec i kóz szczególne znaczenie ma występowanie lentiwirusa małych przeżuwaczy – SRLV powodującego wirusowe zapalenie stawów i mózgu. Zakażenie tym patogenem w początkowych fazach, trwających nawet kilka lat, nie wywołuje objawów klinicznych, co w konsekwencji prowadzi do znacznych strat w stadach małych przeżuwaczy, a w końcu do poważnych strat ekonomicznych. Zasadne jest zatem poszukiwanie testów, szczególnie tych na poziomie molekularnym, umożliwiających wczesne wykrycie zakażenia zwierząt SLRV, dlatego tematyka badawcza rozprawy P. mgr Darii Reczyńskiej jest jak najbardziej aktualna i ma charakter zarówno poznawczy, jak i aplikacyjny.

Zakażenia retrowirusowe, do których zalicza się SRLV często przyczyniają się do powstania nieodwracalnych zmian na poziomie molekularnym, będących początkiem procesu patogenezy licznych chorób. Proces zapalny wywołuje w organizmie szereg zaburzeń hormonalnych, metabolicznych i neurologicznych prowadzących do aktywacji układu immunologicznego, objawiającego się zmianą stężeń niektórych białek ostrej fazy - BOF, co może być wykorzystane, jako jeden ze wskaźników oceny zdrowotności. Analiza stężenia BOF na poziomie molekularnym może dać możliwość wczesnej diagnostyki, co jest szczególnie ważne w identyfikacji zakażeń bezobjawowych, oraz dać szansę na opracowanie skutecznych metod zapobiegawczych.

Fakt ten wykorzystwała Doktorantka i **przyjęła hipotezę badawczą**, zakładając, że lentiwirus małych przeżuwaczy oddziałuje na system immunologiczny organizmu kóz poprzez:

-wpływ na poziom transkryptów genów białek ostrej fazy i katelicydyn w komórkach somatycznych mleka i leukocytach krwi,

- stężenie białek ostrej fazy i katelicydyn w mleku i surowicy krwi.

Ponadto założyła, że zakażenie SRLV może wpływać na profil ekspresji miRNA w komórkach somatycznych mleka i leukocytach krwi,

-oraz, że poziom transkryptów lub/i produktów białkowych genów zaangażowanych w procesy immunologiczne mogą służyć jako biomarker zakażenia SRLV – co według mnie jest już raczej celem pracy, zmierzającym do oceny czy „poziom transkryptów i produktów białkowych genów mogą mieć zastosowanie jako biomarker zakażenia SRLV?”

**Za cel badań** Doktorantka wyznaczyła sobie przeanalizowanie „...wpływu zakażenia SRLV kóz mlecznych na ekspresję genów białek ostrej fazy oraz katelicydyn na poziomie mRNA w komórkach somatycznych mleka i leukocytach krwi oraz na poziomie białka w mleku i surowicy krwi na tej podstawie zidentyfikowanie dodatkowego wskaźnika zakażenia oraz określenie poziomu ekspresji wybranych genów miRNA, mogących mieć wpływ na ekspresję genów białek ostrej fazy i katelicydyn”.

W mojej opinii przedstawienie celu badań w kolejnych punktach przedstawiających zadania jakich podjęła się Autorka pracy byłoby bardziej czytelne i informatywne (o wyborze ras kóz do badań, wskaźników, czy metod dowiadujemy się dopiero w rozdziale Materiał i metody).

Przedłożona do recenzji rozprawa ma formę klasycznej rozprawy naukowej i obejmuje rozdziały: Krótki Wstęp (2 strony), przedstawienie Hipotez badawczych, Cel badań, Przegląd piśmiennictwa (20 stron), Materiał i metody (16 stron), Wyniki i dyskusja przedstawione razem w jednym rozdziale na 56 stronach, Podsumowanie, Wnioski a następnie streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Bibliografia licząca 168 pozycji. Rozprawę kończy wyodrębniona Netografia. Całość pracy łącznie ze spisem treści i wykazem stosowanych skrótów stanowią przejrzystą strukturę całości opracowania liczącą 128 stron maszynopisu.

Doktorantka dokonała szerokiego **Przeglądu piśmiennictwa**. Scharakteryzowała SRLV opisując nie tylko jego taksonomię i genom, ale także procesy zakażenia komórki i replikacji, przebieg i objawy choroby oraz przedstawiła obecnie stosowane metody diagnostyczne zakażeń SRLV zaznaczając, że dotychczas nie udało się opracować skutecznych metod zwalczania chorób wywoływanych przez retrowirusy. Należy również zaznaczyć, że powszechnie stosowane metody immunodifuzy w żelu agarozowym i test ELISA, nie zawsze są wystarczające do wykrycia zakażenia, dlatego wydaje się, że poszukiwanie i zastosowanie metod analizy na poziomie DNA, pozwoli na skuteczniejszą diagnostykę zakażonych zwierząt i ich eliminację ze stad.

Dalej P. magister z dużą starannością dokonała charakterystyki białek ostrej fazy i mechanizmów ich działania. Dokładnie opisała 7 wybranych białek ostrej fazy: Amyloid surowiczy, Haptoglobulina, Ceruloplazmina, Kwaśna alfa -1-glikoproteina, Fibrynogen,  $\alpha$ -Laktalbumina i Białko C-reaktywne. Następnie scharakteryzowała

katelicydyny, a rozdział zakończyła opisem regulacji epigenetycznych zwracając szczególną uwagę na znaczenie ekspresji genów na poziomie mRNA w różnych jednostkach chorobowych u ludzi i zwierząt. Opis poparła liczną, najnowszą literaturą naukową (głównie z 2013-16r.) potwierdzając zasadność wyboru do własnych badań genów mogących być potencjalnymi wskaźnikami w diagnostyce SRLV.

Przegląd piśmiennictwa napisany jest w sposób czytelny i systematyczny, bazuje na licznej literaturze. Autorka wykazała się dobrą znajomością problematyki badawczej rozprawy.

Natomiast niezrozumiałą jest dla mnie podział rozdziału **6. Materiał i metody** na 2 podrozdziały **6.1 Baza doświadczalna – zwierzęta** i **6.2 Analiza statystyczna**.

Pierwszy podrozdział „Baza doświadczalna – zwierzęta” zawiera zarówno opis zwierząt, materiału biologicznego i zastosowanych metod: opisała grupy badawcze zwierząt, zastosowane metody w analizach mikrobiologicznych, fizykochemicznych, molekularnych, a następnie przedstawiła materiał biologiczny (w obrębie którego zawarto analizę krwi i mleka) i metody: odwrotną transkrypcję, Real-Time, test ELISA i profilowanie miRNA.

Taki układ opisu zwierząt doświadczalnych, materiału badawczego i zastosowanych licznych metod badawczych jest trudny do prześledzenia.

Bazę doświadczalną stanowiły kozy dwóch ras mlecznych polska biała uszlachetniona (PWI) i polska barwna uszlachetniona (PFI). Razem do badań wybrano 24 kozy – podzielone na dwie grupy badawcze po 12 osobników. Jedna grupa zwierząt to osobniki wolne od zakażenia, druga naturalnie zakażona SRLV, u których co najmniej dwukrotnie stwierdzono dodatni wynik badań serologicznych. Liczebność zwierząt w obserwowanych grupach wyselekcjonowane, wg rasy i numeru laktacji przedstawiono na rysunku.

Mam uwagi do opisu zwierząt:

Autorka podała jedynie skróty ras kóz PWI i PFI. Myślę, że w metodach, gdzie po raz pierwszy były podane rasy wybrane do badań, powinna być podana najpierw pełna nazwa rasy i stosowany skrót, a później dopiero stosowanie samego skrótu. Szczególnie, że w wykazie skrótów wkraść się błąd w rozwinięciu skrótu rasy PWI. Brak informacji o badanych osobnikach - z jakich stad pochodzą, jak były identyfikowane? Zabrakło również pozycji do odnośnika (IZ-PIB-INRA, 2009).

Do przeprowadzenia badań immunoenzymatycznych oraz analizy molekularnej pobrano razem 480 próbek, 240 próbek mleka i 240 – krwi.

Próbki mleka oraz surowicy krwi wykorzystano do przeprowadzenia testów ELISA, natomiast komórki somatyczne mleka i leukocyty krwi stanowiły materiał wyjściowy do izolacji RNA. Ekspresję wybranych genów przeprowadzono z wykorzystaniem reakcji Real-Time PCR.

Sekwencje starterów badanych genów BOF i katelicydyn przedstawiono w tab. 1., natomiast sekwencje starterowe do profilowania siedmiu wytypowanych do badań miRNA przedstawiono w tab.2. W tytule tabeli nr 1 wymieniono „pozycję w genie”, której nie umieszczono w tabeli.

Zastosowano **testy statystyczne** posłużyły do oszacowania parametrów fizykochemicznych mleka, analizy względnej ekspresji badanych genów i miRNA w komórkach somatycznych mleka i leukocytach krwi oraz stężenia białka w mleku i surowicy krwi.

Zabrakło informacji o teście, na podstawie którego wyliczono istotności różnic poziomów kolejnych ocenianych parametrów (czy zastosowano test chi-kwadrat?)

Otrzymane rezultaty analiz zostały przedstawione i opisane w rozdziale **Wyniki i dyskusja**, wyniki zobrazowano na licznych wykresach (31 wykresów) oraz zebrano w sześciu tabelach.

Przed przystąpieniem do realizacji wyznaczonych głównych celów pracy Doktorantka przeprowadziła **Badania mikrobiologiczne**, które wykazały występowanie w podobnej proporcji bakterii patogennych oraz środowiskowych zarówno w mleku kóz wolnych, jak i kóz zakażonych SRLV, co sugeruje wykluczenie wpływu zakażeń bakteryjnych na odporność kóz.

Analiza **Parametrów fizyko-chemicznych mleka** potwierdziła wcześniejsze badania innych autorów w zakresie wydajności mleka - wykazując brak różnic między zwierzętami zdrowymi a chorymi. Istotne różnice zaobserwowano jedynie w liczbie komórek somatycznych ( $p < 0,01$ ), zawartości suchej masy i suchej masy beztłuszczowej ( $p < 0,05$ ). Dla pozostałych parametrów: tłuszczu, białka, kazeiny, laktozy, kwasu cytrynowego i FFA nie odnotowano istotnych różnic.

W opisie wyników **Ekspresja genów kodujących BOF i katelicydyn na poziomie mRNA i Białka** Pani mgr. Daria Reczyńska stwierdza, że „W badaniach własnych nie wykazała wpływu rasy, numeru laktacji oraz roku pobrania próbek mleka i krwi kóz wolnych od zakażenia i zakażonych SRLV na ekspresję BOF i katelicydyn....., zarówno na poziomie mRNA, jak i białka”, jednak nie prezentuje otrzymanych wyników. Według mojej opinii takie stwierdzenie w pracy naukowej powinno być poparte wynikami chociażby, jako załącznik na końcu rozprawy, czy odnośnikiem do literatury.

Tytuł podrozdziału „**Ekspresja genów kodujących białek BOF i 0katelicydyn na poziomie mRNA i Białka pomiędzy tkankami**” został dość niefortunnie sformułowany – powinien zostać przeredagowany. Prezentowane wyniki ekspresji genów pomiędzy mlekiem a surowicą krwi wykazały wysoce istotne różnice w ekspresji genu *Cp* i *Fby* oraz w stężeniu 4 białek *SAA*, *Hp*, *Cp* i *AGP*, jednak zarówno u kóz zakażonych jak i wolnych od zakażenia.

Natomiast analizę różnic w **ekspresji genów BOF i katelicydyn pomiędzy zwierzętami wolnymi i zakażonymi SRLV**, Doktorantka przedstawiła na wykresach oraz szczegółowo opisała i skonfrontowała z wynikami badaniami dostępnymi w literaturze. Dodatkowo podsumowała wyniki w komórkach somatycznych mleka / mleku oraz leukocytach / surowicy krwi kóz zakażonych w stosunku do kóz wolnych od zakażenia w formie tabelarycznej, co wg mojej opinii jest bardzo dobrą formą przedstawienia wyników ułatwiającą czytelnikowi analizę, porównanie wyników i wnioskowanie. Z tego zestawienia jasno wynika, że u kóz zakażonych w komórkach somatycznych mleka nastąpił wzrost poziomu transkryptu genu *Hp* i stężenia *MAP34* oraz spadek stężenia *SAA*, *Cp* i *MAP28*, natomiast w leukocytach krwi wzrost poziomu transkryptu genu *Hp* i *SAA* oraz stężenia *SAA*.

P. magister Daria Reczyńska, podjęła się i przedstawiła, jako pierwsza badania dotyczące **Ekspresji genów BOF i katelicydyn na poziomie mRNA i białka w trakcie przebiegu laktacji**, jednak nie zaobserwowała różnic w ekspresji BOF i katelicydyn na poziomie mRNA i białka pomiędzy kozami wolnymi a zakażonymi SRLV w poszczególnych stadiach laktacji. Również w wyniku przeprowadzonych analiz miRNA nie wykazała różnic w ekspresji w większości wybranych miRNA

między badanym materiałem biologicznym, zarówno u kóz zdrowych, jak i zakażonych. Jednak na uwagę zasługuje fakt odnotowania ekspresji miR-141 w KSM kóz wolnych od zakażenia, przy jej braku u zwierząt zakażonych oraz odwrotnie w przypadku miR-93-5p, gdzie jego ekspresję stwierdzono jedynie w WBC zwierząt zakażonych.

Otrzymane wyniki Autorka podsumowała w 9 logicznie i jasno skonstruowanych punktach i zakończyła rozważania 6. wnioskami, które odzwierciedlają osiągnięcia naukowe wykonanej pracy i opisują realizację zadań zawartych w celach pracy. Mam jedynie uwagi do wniosków 3 i 4 dotyczących odpowiedzi immunologicznej gruczołu sutkowego, które są zbyt ogólne i nie potwierdzone do końca rezultatami omawianej rozprawy.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska P. mgr Darii Reczyńskiej jest efektem ogromnego nakładu pracy, a zgromadzone wyniki mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań w zakresie poznania mechanizmów immunologicznych występujących przy zakażeniu SRLV oraz w poszukiwaniu skutecznych metod zapobiegania i zwalczania zakażeń. Można przypuszczać, że pomiary poziomu stężeń SAA i Cp we krwi mogą mieć praktyczne zastosowanie w diagnostyce zakażeń wirusowych.

Wymienione w recenzji uwagi szczegółowe mają niemal wyłącznie charakter porządkowy i nie obniżają ogólnej, bardzo pozytywnej oceny merytorycznej treści opracowania. Oceniając wysoko poziom naukowy i aspekty przydatności praktycznej stwierdzam, że praca doktorska P. 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)” spełnia wszystkie wymogi określone Ustawą z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Przedstawiając pozytywną, wysoką ocenę wykonanej pracy przedkładam Wysockiej Radzie Naukowej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu wniosek o przyjęcie pracy mgr Darii Reczyńskiej bez zastrzeżeń i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych badań i aplikacyjny charakter pracy wnioskuje o wyróżnienie pracy.

8. 11. 2018r.



