



Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

ul. Chałubińskiego 5

02-004 Warszawa

tel.: (0-22) 622 00 28

fax: (0-22) 628 27 39

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr. Karoliny Gregorczyk

p.t.: „Badanie wpływu zakażenia wirusem ektromelii na morfologię i dystrybucję sieci mitochondrialnej oraz funkcjonowanie mitochondriów w komórkach permissywnych”

Przygotowanej pod kierunkiem Promotor dr hab. Joanny Szczepkowskiej,
prof. nadzw. Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
w Zakładzie Immunologii, Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny
Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wirus ospy mysiej (Ectromelia virus, ECTV) należy do rodziny *Poxviridae*, podrodziny *Chordopoxvirinae*, rodzaju *Orthopoxvirus*, do której także zaliczane są wirusy krowianki i ospy prawdziwej. Po raz pierwszy został on opisany w 1930 roku przez J. Machalą, a w roku 1945 zaklasyfikowany do rodzaju *Orthopoxvirus*. U genetycznie wrażliwych na zakażenie myszy o haplotypie H-2^a oraz H-2^d patogen ten powoduje wysoce zakaźną chorobę, określaną mianem ektromelii.

Ze względu na duże podobieństwo w przebiegu zakażenia ECTV a wirusem ospy prawdziwej (Variola virus, VARV), wirus ektromelii jest chętnie wykorzystywany jako model doświadczalny do badań nad ortopokswirusami. Prace takie ułatwia jeszcze jego naturalny gospodarz, *Mus musculus*, powszechnie stosowany jako zwierzę laboratoryjne. Wydawać by się mogło, że po ogłoszeniu przez WHO w 1980 roku eradykacji ospy prawdziwej, dalsze prace nad tymi zakażeniami pozbawione są uzasadnienia, jest to jednak twierdzenie błędne. Co prawda wszystkie znane próbki laboratoryjne wirusa ospy prawdziwej zostały zniszczone, oprócz pilnie strzeżonych depozytów znajdujących się w Rosyjskim Państwowym Instytucie Badawczym Wirusologii i Biotechnologii oraz w amerykańskim CDC. Pomimo zarządzeń o ich zniszczeniu, podjętych w latach 1993-1996, są one nadal przechowywane na wniosek grona naukowców postulujących utrzymanie VARV do celów naukowych.

Co pewien czas pojawiają się jednakże doniesienia o przypadkowych odkryciach kolejnych próbek środowiskowych wirusa ospy prawdziwej, tak jak w 2003 roku w kopercie w książce medycznej w Santa Fe, czy w lipcu 2014 roku, gdy w pomieszczeniu gospodarczym laboratorium Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH) w Bethesda przypadkowo odkryto próbki VARV pochodzące z lat 50-tych ubiegłego wieku.

Dodatkowy problem sprawia drastycznie malejąca odporność populacyjna w kierunku VARV. Szczepienia przeciw ospie prawdziwej nie znajdują się bowiem w kalendarzu szczepień obowiązkowych od 1980. Co prawda, w Szwajcarii znajdują się nadal zapasy szczepionkowego wirusa krowianki (*Vaccinia virus*, VACV), lecz skuteczność tych preparatów po tak długim czasie może budzić wątpliwości. Osoby, które były szczepione ponad 30 lat temu, mają obecnie znikomą odporność. W USA po zamachach bronią biologiczną w 2001 roku opracowano za pomocą technik inżynierii genetycznej nowy typ szczepionek przeciw ospie prawdziwej, lecz ich skuteczność jest niższa od stosowanych dawniej szczepionek bazujących na kompletnym wirusie krowianki. Powrót do powszechnych szczepień z użyciem VACV nie jest obecnie rozpatrywany, ze względu na istotne ryzyko powikłań, zwłaszcza dla osób z zaburzeniami odporności. Wszystko to sprawia, że dalsze badania nad patomechanizmem zakażeń pokswirusami ludzi i zwierząt znajdują głębokie uzasadnienie.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Karoliny Gregorczyk liczy 167 stron, w układzie typowym z podziałem na wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, informacje dodatkowe poświęcone źródłom finansowania oraz bibliografię i dorobkowi naukowemu Doktorantki. Prócz tego na początku pracy zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim, spis treści oraz wykaz stosowanych skrótów, zaś na końcu dysertacji, po piśmiennictwie liczącym 256 pozycji, znalazł swe miejsce spis 49 rycin oraz 9 tabel.

W rozdziale „Wstęp” Autorka przedstawiła zwięzłą charakterystykę budowy i funkcjonowania mitochondriów oraz pełnionej przez nie roli w odporności przeciwwirusowej. W dalszej części znalazł się opis hamowania przez wirusy przekazywania sygnałów do produkcji interferonów i cytokin prozapalnych oraz wpływu zakażenia wirusowego na hamowanie zjawiska apoptozy. Omówiona została także systematyka rodziny *Poxviridae*, z uwzględnieniem ich budowy oraz cyklu

replikacyjnego oraz przebiegu klinicznego zakażenia wirusem ektromelii u naturalnego gospodarza. Na uwagę zasługuje przemyślany dobór piśmiennictwa przez Autorkę, które stanowi pełen obraz problematyki zakażeń spowodowanych przez pokswirusy oraz wpływu zakażeń wirusowych na funkcjonowanie mitochondriów.

Dwa cele pracy zostały sformułowane przez Doktorantkę jasno i zrozumiale. Opatrzono je ponadto je krótkim wstępem, który znacząco ułatwia zrozumienie przesłanek podjęcia tej właśnie tematyki badań.

Rozdział „Materiał i metody” zawiera drobiazgowy opis linii komórkowych użytych w doświadczeniach, wykorzystanego szczepu wirusa ektromelii oraz niezbędnych odczynników. materiału klinicznego stosowane podczas eksperymentów. Podobnie dokładnie Doktorantka scharakteryzowała użyte w toku badań metody, które zostały dobrane w sposób absolutnie prawidłowy, umożliwiając w pełni osiągnięcie założonych celów pracy.

W rozdziale „Wyniki”, Autorka opisała zmiany morfologii wrażliwych komórek *in vitro* podczas zakażenia wirusem ektromelii, omawiając szczegółowo tworzenie wypustek cytoplazmatycznych, i tworzenie fabryk wirusowych w zakażonych komórkach linii L929 i RAW 264.7. Kolejnym elementem badań było obserwowanie zmian w organizacji sieci mitochondrialnej w komórkach permissywnych zakażonych ECTV-MOS w porównaniu do komórek niezakażonych. Badania te wykazały, iż sieć mitochondrialna w zakażonych komórkach ulegała fragmentacji z wytworzeniem pojedynczych mitochondriów, które kolokalizowały z wirionami ECTV. Sugerować to może, że mitochondria biorą udział w transporcie wirionów potomnych wewnątrz i/lub na zewnątrz zakażonych komórki lub są źródłem błon do budowy osłonki wirusowej. Dodatkowymi elementami badań było wykrywanie apoptozy oraz poziomu reaktywnych form tlenu i ATP w zakażonych mysich fibroblastach linii L929. Świadczy to o dogłębnym zrozumieniu problematyki cytobiologii w kontekście zakażeń wirusowych przez Doktorantkę. Na szczególne podkreślenie zasługuje oprawa graficzna rozdziału „Wyniki”, bowiem to właśnie doskonale opracowane zdjęcia stanowią istotę niniejszej rozprawy doktorskiej. część Doktorantka przygotowała w mojej opinii Zaprezentowana forma przedstawienia uzyskanych rezultatów badań jest przejrzysta i uporządkowana, a czytający ma wrażenie, iż wydobyto z nich maksymalną możliwą ilość informacji.

Rozdział „Dyskusja” został przeprowadzony przez mgr Karolinę Gregorczyk w sposób zasługujący na wyrazy uznania. Doktorantka omówiła uzyskane wyniki w kontekście dostępnych danych literaturowych, zawierając także odniesienia do interesujących z mojego punktu widzenia obserwacji wpływu ludzkich wirusów na funkcjonowanie sieci mitochondrialnej zakażonych komórek. W mojej opinii część ta objęła wszystkie możliwe aspekty zagadnień, których dotyczyć powinna niniejsza dysertacja. Całość rozprawy doktorskiej Autorka opatrzyła natomiast czterema logicznymi wnioskami, które wynikają z treści pracy.

Pragnę wspomnieć, że przedłożona mi do oceny dysertacja doktorska mgr. Karoliny Gregorczyk stanowi poważne wyzwanie, napisana bowiem została jasno i zrozumiale. Błędy znalezione przeze mnie w tekście są nieznaczne i mają raczej charakter edytorski:

- w „Wykazie skrótów” Autorka powinna ujednoczyć stosowaną nomenklaturę wirusów. Część z nich bowiem figuruje pod nazwami tradycyjnymi (EBV, HCMV, MCMV), inne natomiast opatrzone są skrótami wynikającymi z aktualnej systematyki ICTV (HHV-1, HHV-6 czy HHV-8). Ponadto od 2014 roku ludzki herpeswirus typu 6 funkcjonuje jako dwa niezależne patogeny, znane obecnie jako HHV-6A i HHV-6B.
- na stronie 23 „Wstępu” Rosyjski Państwowy Instytut Badawczy Wirusologii i Biotechnologii został umieszczony w miejscowości **Koltsovo**, gdzie z obowiązującym zapisem nazw rosyjskojęzycznych nazwa ta powinna brzmieć **Kolcowo**.

Uwagi te w najmniejszym stopniu nie wpływają na merytoryczną wartość niniejszej dysertacji, ani nie obniżają mojej wysokiej oceny jej strony redakcyjnej. Ponadto, jak każda dobrze przeprowadzona rozprawa doktorska i ta budzi swojego rodzaju niedosyt oraz stawia pytania warte dalszego wyjaśniania. Doktorantka przeprowadziła bowiem badania wpływu zakażenia wirusowego na funkcjonowanie mitochondriów wykorzystując dość nietypowy jak na wirusy DNA czynnik zakaźny. Pokswirusy, a z nimi także wirus ektromelii, w przeciwieństwie do innych wirusów, których materiałem genetycznym jest DNA, replikują się w cytoplazmie zakażonej komórki, wnosząc ze sobą praktycznie kompletny aparat replikacyjny. Powoduje to niestety, że wyników uzyskanych w przedstawionej pracy doktorskiej nie można łatwo przenieść na inne rodziny wirusów. Jednocześnie skłania to, a wręcz prowokuje, do kontynuacji powyższych eksperymentów z zastosowaniem innych wirusów DNA, takich jak choćby herpes- czy adenowirusy.

Z całym przekonaniem stwierdzam więc, iż w mojej opinii rozprawa doktorska mgr. Karoliny Gregorczyk spełnia wymogi Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U. 2003 nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się też o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr. Karoliny Gregorczyk p.t.: „Badanie wpływu zakażenia wirusem ektromelii na morfologię i dystrybucję sieci mitochondrialnej oraz funkcjonowanie mitochondriów w komórkach permissywnych”.

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

T. Dzieciatkowski

dr hab. n. med. Tomasz Dzieciatkowski