

dr hab. Mariola Dutkiewicz
Zakład Biochemii RNA

28 stycznia 2022, Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Beaty Gad
z tytułem

„Genotypowa i fenotypowa charakterystyka izolatów klinicznych i środowiskowych
wirusów Coxsackie B krążących w Polsce w latach 1999-2019”

Praca doktorska Pani magister inżynier Beaty Gad została wykonana pod opieką Pani dr hab. n. med. Magdalena Wieczorek w Zakładzie Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH – PIB. Celem pracy jest charakterystyka izolatów klinicznych i środowiskowych wirusów Coxsackie B (CVB) krążących w Polsce w latach 1999-2019. Uzasadnieniem dla podjętej problematyki było częste wykrywanie w Polsce wirusów Coxsackie B, a jednocześnie brak danych opisujących zróżnicowanie genetyczne oraz typy krążące w populacji. Żeby osiągnąć wyznaczony cel, Doktorantka analizowała sekwencje szeregu izolatów wirusów CVB za pomocą technik eksperymentalnych oraz programów komputerowych, a także badała *in vitro*, w wybranych hodowlach komórkowych, różnice w tropizmie komórkowym i replikacji wyselekcjonowanych izolatów CVB. Analiza porównawcza, filogenetyczna, analiza zmienności genu białka powierzchniowego VP1 oraz jego składu aminokwasowego, a także zbadanie stopnia zmienności regionu 3D kodującego wirusową polimerazę, powinno wyjaśnić szereg zagadnień związanych ze zmiennością genetyczną wirusów CVB. Dodatkowo, charakterystyka potencjalnej zdolności CVB do tworzenia nowych wariantów genetycznych, może mieć istotny wpływ na poprawę jakości diagnostyki oraz rozwijanie metod kontroli tych patogenów.

We wprowadzeniu literaturowym liczącym 24 strony Doktorantka nakreśla tło historyczne odkrycia i badań nad wirusami Coxsackie, przedstawia klasyfikację rodzaju *Enterovirus*, a następnie omawia budowę molekularną wirusów Coxsackie B. Charakteryzuje receptory komórkowe i ich wykorzystanie do wnikięcia wirusa do komórki gospodarza, a następnie przystępnie omawia wirusowe białka, cykl replikacyjny CVB, oraz źródła

zmienności genetycznej wirusów, szczególnie CVB. W dalszej części wprowadzenia znajdujemy wiele informacji dotyczących przebiegu zakażenia, patogenezy i epidemiologii, a także diagnostyki i możliwości terapeutycznych chorób wywoływanych przez wirusy CVB.

Następnym rozdziałem są „Materiały i metody”, w których opisane są m.in. źródła materiału biologicznego użyte do analiz, izolaty wirusów, zastosowane techniki eksperymentalne, takie jak izolacja RNA, RT-PCR, elektroforeza żelowa, hodowle komórkowe i sposoby namnażania wirusów oraz metody analizy filogenetycznej i statystycznej. Podane opisy procedur są dokładne i rzetelne, umożliwiające powtórzenie badań. Wszystkie analizy wykonane były wielokrotnie, co budzi zaufanie do uzyskanych wyników.

Opis wyników zajmuje największą część pracy doktorskiej i obfituje w szereg rycin (44) oraz zestawień tabelarycznych, których jest w tym rozdziale ponad 40, nie licząc obszernego załącznika zawierającego kolejnych 20 tabel. Tak duża ilość zestawień wynika z jednej strony ze specyfiki pracy, analizującej dużą ilość prób biologicznych, w tym przypadku 270 wirusowych izolatów, ale także z szerokiej perspektywy przeprowadzonych badań i analiz. Otrzymane wyniki pogrupowane są w trzy główne podrozdziały. W pierwszym, przedstawiona jest identyfikacja typów wirusów Coxsackie B krążących w Polsce w latach 1999-2019, w drugim następuje ich szczegółowa charakterystyka molekularna, a w trzecim ocena kinetyki replikacji wybranych izolatów CVB3 i CVB5 w hodowlach komórkowych, mających reprezentować różne narządy: A549 (płuca), Huh 7.5 (wątroba), HT-29 (jelito grube), PANC-1 (trzustka), SHSY5Y (mózg). Jakość przeprowadzonych badań i sposób przedstawienia wyników nie budzi zastrzeżeń. Na szczególne uznanie zasługuje ogrom włożonej tu pracy eksperymentalnej, analitycznej i edytorskiej.

Dyskusja rozciągająca się na 22 stronach przedstawia otrzymane wyniki w kontekście badań obecnych w literaturze i wyczerpująco omawia wnioski, które w liczbie 10, są przedstawione w sposób klarowny i prezentują wartościowy wkład niniejszej pracy w wiedzę na temat zmienności genetycznej wirusów CVB występujących na terenie Polski w ostatnich dekadach. Wskazują też konkretne korzyści wynikające z przeprowadzonych badań i kierunki dalszych, w celu poszerzania wiedzy i lepszej kontroli nad patogenami z grupy CVB.

Praca napisana jest poprawną polszczyzną, przystępnie i fachowo. Z drobnych niezręczności językowych zauważyłam dwie: Na początku rozdziału „Wyniki” autorka pisze

o 270 wirusach zgromadzonych w Zakładzie Wirusologii. Może bardziej poprawnym wyrażeniem byłoby „270 izolatów wirusów”, tak jak to ma miejsce na dalszych kartach. Innym, niekoniecznie poprawnym, zwrotem jest występujący we wprowadzeniu skrót myślowy „wirus kontroluje syntezę RNA w taki sposób, aby zostało utworzonych około 50 razy więcej nici dodatnich RNA niż ujemnych”. Wydaje się, że jest to raczej wartość wypadkowa kilku czynników, która okazała się ewolucyjnie korzystna i utrwalona, a nie celowe działanie wirusa.

Chciałabym prosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących uwag i pytań, podczas obrony, jednocześnie zaznaczając, że wskazane przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości niniejszej pracy doktorskiej.

1. W omówieniu epidemiologii CVB jest mowa o ich szkodliwości szczególnie wobec zdrowia i życia noworodków i dzieci. Zabrakło mi jednak informacji, z którą kiedyś się spotkałam, że wirusy te są główną przyczyną nagłej śmierci w grupie młodych dorosłych. Czy nowsze badania tego nie potwierdzają?

2. Zaskakujące okazało się oznaczenie dużej zmienności genetycznej w regionie kodującym polimerazę wirusową - jeden z najbardziej zachowawczych regionów genomu tych wirusów. Szkoda, że nie przeprowadzono analizy tego regionu pod kątem mutacji synonimicznych, zarówno w kontekście budowy białka, jak i w kontekście zachowania struktury drugorzędowej RNA, która w przypadku CVB3 została zaproponowana w literaturze dla obszernych fragmentów tego regionu.

3. Wyniki niniejszej pracy pokazują, że w wybranych do badania tropizmu i kinetyki replikacji, nowotworowych liniach komórkowych, potrafią namnażać się zarówno wybrane izolaty kliniczne jak i środowiskowe CVB. Czy właściwość tę posiadają również referencyjne izolaty wirusów CVB5 - „Faulkner” i CVB3 - „Nancy”, a jeśli nie, to co może być tego przyczyną?

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny praca Pani mgr inż. Beaty Gad spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13. Ustawy z dnia

14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. 2017, poz. 1789).

W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH – Państwowego Instytutu Badawczego o nadanie Pani mgr inż. Beacie Gad stopnia doktora w dziedzinie nauk o zdrowiu.


Mariola Dutkiewicz