

prof. dr hab. Mirosław Polak

Dział Wirusologii i Chorób Wirusowych Zwierząt

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. **Michaliny Marii Bartak**

pt. **„Mechanizmy neuropatogenezy oraz neurotropizmu MHV (Mouse Hepatitis Virus) oraz SDAV (Sialodacryoadenitis Virus) na modelu in vitro hodowli pierwotnej mysich komórek centralnego układu nerwowego – astrocytów, neuronów oraz mikrogleju”**

przygotowanej w formie monotematycznego cyklu prac doświadczalnych oraz pracy przeglądowej

w Katedrze Nauk Przedklinicznych

Instytutu Medycyny Weterynaryjnej

Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

pod kierunkiem **dr hab. Joanny Cymerys-Bulendy, prof. SGGW**

Dysertację doktorską przygotowano jako zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych (zgodnie z wymaganiami art. 187 ust.1, pkt.3 obowiązującej obecnie Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 20 lipca 2018 r. Dz. U. poz. 1668 z późn. zmianami) pod wspólnym tytułem **„Mechanizmy neuropatogenezy oraz neurotropizmu MHV (Mouse Hepatitis Virus) oraz SDAV (Sialodacryoadenitis Virus) na modelu in vitro hodowli pierwotnej mysich komórek centralnego układu nerwowego – astrocytów, neuronów oraz mikrogleju”** Zbiór ten składa się z pracy przeglądowej i 3 prac doświadczalnych. Wszystkie artykuły opublikowano w czasopiśmie angielskojęzycznym z listy JCR.

We wszystkich czterech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, co świadczy o jej wiodącej roli w ich powstaniu. Dotyczy to wszystkich etapów obejmujących: tworzenie koncepcji zarówno pracy przeglądowej, jak i prac doświadczalnych, wyboru metodologii i wykonania badań doświadczalnych, końcowej analizy wyników, przygotowania manuskryptów oraz ich korekty w odpowiedzi na uwagi recenzentów. Zostało to potwierdzone deklaracjami głównego

autora w podsumowaniach prac („Author Contributions”), a zaakceptowanymi też, co do ich treści oraz osobistego wkładu, przez pozostałych twórców wymienionych w szeregu autorów. Indywidualny wkład pracy Doktorantki w 3 publikacjach doświadczalnych wyniósł 70%, 65% oraz 70%. Prace te zostały zamieszczone w uznanych i renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i wysokich wskaźnikach bibliometrycznych (sumaryczny wskaźnik wpływu tych prac IF = 18,12; liczba punktów wg listy czasopism MNiSW - 520 pkt.). Oznacza to, że przed ich opublikowaniem przeszły niewątpliwie wieloetapową i wnikliwą ocenę na drodze recenzji pod kątem ich jakości i słuszności przyjętych założeń, metod badawczych, uzyskanych wyników i przedstawionych wniosków.

Należy zatem przyjąć, że pod względem formalnym i naukowym spełniają one wszystkie przyjęte kryteria i trudno je w tej kwestii ponownie oceniać. Potwierdzić można jednak ich dużą wartość naukową oraz niewątpliwie zasługi i wkład Doktorantki w poszerzenie aktualnej wiedzy w interesującym ją przedmiocie obejmującym neuropatogenezę i neurotropizm dwóch koronawirusów gryzoni. Badania te znalazły swój finał w przygotowanej przez Doktorantkę dysertacji doktorskiej.

Układ rozprawy doktorskiej poza streszczeniem, wykazem publikacji i wykazem skrótów zawiera typowy układ pracy doświadczalnej ze wstępem, celem pracy, materiałami i metodami badań, wynikami, dyskusją oraz podsumowaniem i wnioskami. Bibliografia dołączona do rozprawy doktorskiej zawiera 129 pozycji piśmiennictwa i prawie połowa z nich (56) pochodzi z lat 2020-2024, co potwierdza aktualność podjętej tematyki badawczej.

Globalna pandemia COVID-19 miała znaczący wpływ na życie i zdrowie ludzi na całym świecie. Do 13.04.2024 r. zanotowano ponad 704 mln zachorowań oraz ponad 7 mln zgonów. W Polsce zachorowało ponad 6,6 mln ludzi, a ponad 120 tys. zmarło. Chociaż większość zakażonych osób przeżyło ostre skutki pandemii, u wielu osób zaobserwowano objawy tzw. długiego COVID obejmujące zmęczenie, duszność, zaburzenia funkcji poznawczych, trudności ze snem, gorączkę oraz niepokój i depresję. Nawet u osób, które nie chorowały obserwowane są negatywne zmiany w zachowaniu z powodu stresu związanego z pandemią.

Rodzina Coronaviridae obejmuje wirusy, które zakażają ptaki i ssaki. Są one odpowiedzialne za choroby układu oddechowego, nerwowego i pokarmowego.

Najbardziej znane choroby zwierząt gospodarskich wywoływane przez te patogeny to zakaźne zapalenie oskrzeli u drobiu, zakaźne zapalenie otrzewnej kotów czy epidemiczna biegunka świń. W medycynie ludzkiej opisano 7 gatunków koronawirusów wywołujących zachorowania człowieka z najbardziej znanym β -koronawirusem zespołu ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej typu 2: SARS-CoV-2. Pod koniec kwietnia 2021 r. SARS-CoV-2 został wykryty w dwóch fermach nerek w Holandii, gdzie zaobserwowano u zwierząt problemy ze strony układu pokarmowego i oddechowego oraz ich zwiększoną śmiertelność. Podejrzewa się, że wirus został przeniesiony na zwierzęta przez zakażonych pracowników ферmy (u kilku wystąpiły objawy COVID-19), a następnie rozprzestrzenił się między norkami jak również dochodziło do transmisji SARS-CoV-2 od zwierząt do ludzi. Przypadki COVID-19 u nerek zanotowano także w Danii i w Polsce. Takie przypadki zakażeń zwierząt SARS-CoV-2 od ludzi określane są terminem zooantroponoza lub odwrócona zoonoza.

Neurotropizm koronawirusów nie jest do końca poznany, a częste mutacje materiału genetycznego koronawirusów wskazują na potencjalne zagrożenie dla człowieka nie tylko ze strony SARS-Cov-2. Jak wskazują dane literaturowe wszystkie zakażenia ludzi wywołane przez koronawirusy były efektem przekroczenia bariery międzygatunkowej człowiek-zwierzę. W przypadku SARS-CoV-2 był to prawdopodobnie nietoperz. Dlatego też nie można wykluczyć ryzyka ewentualnych zachorowań ludzi po zakażeniu koronawirusami gryzoni takimi jak wirus mysiego zapalenia wątroby czy szczurzy koronawirus zapalenia gruczołów ślinowych i węzłów chłonnych które to wirusy były przedmiotem zainteresowań badawczych Pani mgr inż. Michaliny Marii Bartak.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w pełni w trend zainteresowań naukowo-badawczych rozwijanych bardzo szeroko w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie, szczególnie w ostatnich latach. Badania Doktorantki służyły realizacji trzech celów badawczych:

- I) zbadanie mechanizmów interakcji MHV i SDAV z komórkami OUN in vitro;**
- II) określenie profilu cytokin wydzielanych przez komórki atrocytów i mikrogleju podczas zakażenia tymi wirusami oraz**
- III) wpływ zakażenia MHV oraz SDAV na produkcję reaktywnych form tlenu i żywotność astrocytów i mikrogleju.**

Prace doświadczalne Doktorantki poprzedziła praca przeglądowa. Dokonano w niej szczegółowej analizy dostępnej literatury w zakresie szczurzego koronawirusa - SDAV w kontekście jego potencjału zoonotycznego. Opisano sposób szerzenia się zakażenia, objawy kliniczne choroby oraz możliwości diagnostyczne. W kolejnych podrozdziałach pracy przedstawiono klasyfikację tego patogenu w rodzinie koronawirusów, strukturę wirionu, funkcje zarówno genów, jak i białek SDAV oraz proces zakażania komórek i cykl replikacyjny wirusa. Wskazano, że dostępna literatura opisuje jedynie zakażenia układu oddechowego wywoływane przez ten wirus i brakuje badań nad oddziaływaniem tego patogenu na układ nerwowy gospodarza. Tekst uzupełnia pięć rycin, z których trzy są autorstwa Doktorantki. Praca ta stanowi doskonałe kompendium wiedzy na temat jednego z przedmiotów zainteresowań Doktorantki, jakim był wirus SDAV.

W części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej Doktorantka wyodrębniła sześć zadań badawczych, które zostały zaprezentowane w trzech publikacjach doświadczalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

W pierwszym etapie badań określono efekt zakażenia wirusami MHV-JHM (szczep neurotropowy VR-76513) oraz SDAV (szczep 682) komórek hodowli pierwotnej mysich neuronów, astrocytów i mikrogleju *in vitro*. Wirusy te pierwotnie namnożono na mysich hepatocytach (MHV) oraz komórkach nabłonka płuca szczura (SDAV). Efekt cytopatyczny oceniano z wykorzystaniem systemu do przyżyciowej obserwacji komórek, który umożliwia monitorowanie zmian w czasie rzeczywistym. Wykorzystano także technikę barwienia immunofluorescencyjnego antygenu wirusowego i białek komórkowych oraz technikę obrazowania za pomocą mikroskopii konfokalnej klasycznej i wysokoprzepustowej.

W kolejnym etapie badań (opisanym w publikacji nr 2) określono wpływ zakażenia MHV na elementy cytoszkieletu (mikrotubule oraz filamenty aktynowe) neuronów hodowanych *in vitro* z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej oraz techniki RT-qPCR.

W publikacji nr 3 scharakteryzowano proces uwalniania wirionów potomnych SDAV z neuronów hodowanych *in vitro* określając rolę VCP z użyciem mikroskopii konfokalnej oraz przyżyciowego systemu monitoringu hodowli komórkowej. Zastosowano także technikę analizy wysokoprzepustowej z wykorzystaniem mikroskopu i programu komputerowego do oceny poziomu fluorescencji.

W czwartym etapie badań (opisanym w publikacji nr 4) oceniono odpowiedź komórkową badając wpływ zakażenia MHV oraz SDAV na mikroglej i astrocyty hodowane in vitro podczas miesięcznego zakażenia z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej, cytometrii przepływowej, wysokoprzepustowego testu immunologicznego, systemu Luminex dla 48 cytokin i chemokin oraz klasycznego testu ELISA dla wybranych cytokin.

W analizie statystycznej zastosowano jedno- i dwu-czynnikową analizę wariancji z testem post-hoc oraz testy nieparametryczne Kruskal-Wallis i Friedman z testem post-hoc lub niesparowanym testem t studenta. Do analiz wykorzystano program komputerowy GraphPad™. Każdy eksperyment wykonano przynajmniej w 3 powtórzeniach biologicznych i technicznych, a różnice statystyczne zdefiniowano jako wysoce istotne przy $p \leq 0,001$, za istotne dla $p \leq 0,05$ i $p \leq 0,01$ oraz jako nieistotne przy $p \geq 0,05$. Dane te wskazują na rzetelne podejście do badań i chęć uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych wyników prac doświadczalnych, potwierdzonych odpowiednią analizą statystyczną.

Ocena zmian architektury cytoszkieletu neuronów podczas replikacji koronawirusa myszy MHV-JHM, wykazała, że cytoszkielet aktynowy jest kluczowy na etapie składania i opuszczania neuronów przez wiriony potomne. Natomiast nanorurki (mikrotubule) odpowiedzialne są głównie za wewnątrzkomórkowy transport wirionów MHV-JHM, co zapobiega aktywacji odpowiedzi komórkowej (**publikacja nr 2**) i ułatwia skuteczniejsze rozprzestrzenianie się wirionów w neuronach. W pracy tej po raz pierwszy opisano zmiany w cytoszkiecie aktynowym w trakcie zakażenia neuronów MHV-JHM.

W **publikacji nr 3** wykonano przyżyciową obserwację hodowli pierwotnych neuronów po zakażeniu SDAV, która była pierwszą tego typu analizą tego wirusa. Umożliwiła ona potwierdzenie produktywnego zakażenia w postaci syncytialnego oraz ogniskowego efektu cytopatycznego. Po raz pierwszy wykazano, że SDAV zwiększa ekspresję VCP w neuronach, co wyjaśnia wykorzystanie tej ATPazy w cyklu replikacji wirusa. Potwierdzeniem kluczowej roli tego białka było zastosowanie inhibitora VCP, co doprowadziło do wysoce istotnego statystycznie spadku miana wirusa. Białko VCP wykazuje powinowactwo do retikulum endoplazmatycznego, a ponieważ do uwalniania strukturalnych białek wirusowych dochodzi właśnie tam,

można założyć jako wysoce prawdopodobny udział VCP w późniejszych etapach replikacji SDAV.

W ostatniej pracy oryginalnej cyklu (**publikacja nr 4**) w trakcie miesięcznej obserwacji potwierdzono indukcję apoptozy przez obydwa wirusy, zarówno w mikrogleju jak i astrocytach. Analiza ilości wytwarzanych reaktywnych form tlenu (ROS) wykazała szybki i istotny wzrost ich produkcji po zakażeniu obydwoma wirusami, a wysoki poziom ROS utrzymujący się przez co najmniej tydzień (MHV) lub 1 miesiąc (SDAV) sugeruje przedłużony stan stresu oksydacyjnego w mikrogleju i astrocytach. Nasila to stan zapalny i może prowadzić do rozwoju encefalopatii (zapalenie mózgu). Analiza porównawcza profilu cytokin i chemokin wydzielanych przez zakażone komórki glejowe wykazała, że SDAV indukuje znacznie szerszy profil cytokin w porównaniu do MHV. Stwierdzono różnice w rodzajach cytokin stymulowanych przez obydwa wirusy po miesiącu od zakażenia hodowli pierwotnej mysich komórek centralnego układu nerwowego. Podsumowując, badania wykonane przez Doktorantkę w sposób jednoznaczny potwierdzają neurotropowy charakter obydwu koronawirusów w oparciu o ocenę ich interakcji z neuronami, mikroglejem i astrocytami.

Z obowiązku Recenzenta należy tylko dodać, że opublikowanie prac stanowiących dysertację doktorską w renomowanych czasopismach naukowych daje też rękojmię ich niekwestionowanej wartości naukowej i z tych względów ewentualny krytyczny wgląd w ich treść należy uznać za nieco spóźniony. W trzech publikacjach doświadczalnych Pani mgr inż. Michalina Maria Bartak zadeklarowała swój indywidualny wkład pracy na poziomie 70%, 65% i 70%, co potwierdza jej wiodącą rolę w projektowaniu i wykonaniu badań, analizie uzyskanych wyników oraz przygotowaniu publikacji. **Choć nie ma takiego wymogu to jednak należy wskazać, że brakuje oświadczeń niektórych współautorów prezentowanych publikacji co do ich udziału i wkładu w przygotowanie przedstawionych opracowań naukowych.** Dla pracy przeglądowej brakuje takich oświadczeń od wszystkich współautorów. W trzech publikacjach doświadczalnych brakuje oświadczeń 1, 3 oraz 3 współautorów, co uniemożliwia weryfikację deklarowanego udziału procentowego Doktorantki w przygotowanie publikacji przedstawionych w ramach rozprawy doktorskiej. Z drugiej strony na końcu każdej publikacji podany jest wkład każdego z autorów w przygotowanie danego opracowania, co pośrednio

pozwała ocenić skalę zaangażowania Doktorantki w prowadzone badania. Wspomniana uwaga nie ma istotnego wpływu na ogólną bardzo dobrą ocenę przygotowanej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że recenzowana rozprawa doktorska wnosi nowe dane do nauki i pogłębia wiedzę z zakresu interakcji obydwu koronawirusów gryzoni z komórkami OUN, a Pani mgr inż. Michalina Maria Bartak bardzo dobrze wywiązała się z postawionego sobie zadania. Potwierdziła efektywną replikację MHV w neuronach pierwotnych poprzez zaobserwowane zmiany morfologiczne w postaci kondensacji filamentów aktynowych, obecność licznych struktur nanorurek oraz cystern mikrotubularnych w neurytach. W oparciu o dane literaturowe wiadomym było, że koronawirusy szczurów wykazują tropizm do gruczołów ślinowych, gruczołów łzowych i nabłonka układu oddechowego bez dowodów na zaangażowanie układu nerwowego. Dlatego jako nowatorskie należy uznać wyniki badań Doktorantki, które wykazały produktywną replikację SDAV w neuronach *in vitro* bez konieczności adaptacji wirusa, co potwierdziło jego neurotropizm. Po raz pierwszy wykazano, że SDAV zwiększa ekspresję białka VCP w neuronach, co wyjaśnia wykorzystanie tej ATPazy w replikacji wirusa. W oparciu o te wyniki, uznano MHV i SDAV za dobry model do oceny wpływu zakażenia tymi wirusami na hodowlę pierwotną mikrogleju i astrocytów. W dalszych pracach podjęto próbę scharakteryzowania typu śmierci komórek, poziomu produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) i ekspresji cytokin/chemokin w odpowiedzi na zakażenie tymi patogenami potwierdzając m.in. występowanie apoptozy, przedłużony stan stresu oksydacyjnego w mikrogleju i astrocytach, co może prowadzić do rozwoju encefalopatii oraz różnice w profilach cytokin oraz w rodzajach cytokin stymulowanych przez obydwa wirusy po miesiącu od zakażenia hodowli pierwotnej mysich komórek centralnego układu nerwowego.

Doświadczenia zostały wykonane przy użyciu nowoczesnych metod badawczych, takich jak: mikroskopia konfokalna, RT-qPCR, western-blot, obrazowanie przyżyciowe komórek czy wysokoprzepustowa mikroskopia konfokalna, które zagwarantowały wiarygodność uzyskanych wyników prowadzonych badań. W pracach doświadczalnych stanowiących dysertację doktorską zamieszczono rzetelnie wykonaną i obszerną dokumentację graficzną z przeprowadzonych badań, która

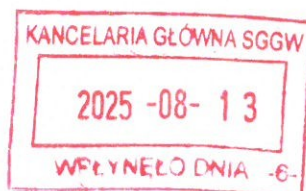
ułatwia czytającemu weryfikację prezentowanych wyników badań (11, 11 oraz 8 rycin).

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pani **mgr inż. Michaliny Marii Bartak** pt. **„Mechanizmy neuropatogenezy oraz neurotropizmu MHV (Mouse Hepatitis Virus) oraz SDAV (Sialodacryoadenitis Virus) na modelu in vitro hodowli pierwotnej mysich komórek centralnego układu nerwowego – astrocytów, neuronów oraz mikrogleju”** odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) i przedkładam Radzie Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie Panią mgr inż. Michalinę Marię Bartak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie mając na względzie oryginalny zakres tematyczny prowadzonych badań, ich aktualność oraz zastosowanie wielu technik badawczych, które pozwoliły na uzyskanie ciekawych wyników badań wnoszę o uhonorowanie Pani mgr inż. Michaliny Marii Bartak stosowną nagrodą lub wyróżnieniem.


Prof. dr hab. Mirosław P. Polak

Puławy, 08.08.2025 r.



Pan
Dr hab. Tomasz Sadkowski, prof. SGGW
Przewodniczący Rady Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Wasze pismo z dnia: 18.06.2025 r.
Znak: BON.5100.20.2025

Nasz znak:

Data: 11.08.2025

Dotyczy: recenzja rozprawy doktorskiej

Szanowny Panie Profesorze,
Dziękując za powołanie mnie na recenzenta w załączeniu przesyłam recenzję rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Michaliny Marii Barta kpt.: „Mechanizmy neuropatogenezy oraz neurotropizmu MHV (Mouse Hepatitis Virus) oraz SDAV (Sialodacryoadenitis Virus) na modelu in vitro hodowli pierwotnej mysich komórek centralnego układu nerwowego – astrocytów, neuronów oraz mikrogleju”.

Z poważaniem,

Prof. dr hab. Mirosław P. Polak

PAŃSTWOWY INSTYTUT WETERYNARYJNY-

PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Tel. (81) 889-30-00, fax (81) 886-25-95

Regen 000080252, NIP 716-00-10-761

FOUNDA

PRIORITY

(00)859007734525719723

𠂇

(00)859007734525719723

(00)859007734525719723

Poczta Polska

Oplatá pobrana _____ zľ _____ gr _____

2025

AM 120082025 PULAWY 1

PPH/21829/2025

KANCELARIA GŁÓWNA SGGW

2025-08-13

WPLYNEŁO DNIA -8-

Biore Oblique Mark

Skote Gbura Gop. Wikipiego

Ol. Novosyonskoe 166

02-787 Warthe

KORFUT

OPŁATA POROBNĄ TAŁE PERÇE-POŁOCHNE

Umowa D2-23/134/24/6 z Poczta Polska S.A.
z dnia 30.10.2024. Nadano w Puławach
ID nr 561448/L

ID nr 561448/L