



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Michaliny Marii Bartak

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, prof. dr hab. Tomasza Sadkowskiego z dnia 18 czerwca 2025 roku. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska „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” została przygotowana przez mgr inż. Michalinę Marię Bartak pod kierunkiem dr hab. Joanny Cymerys-Bulenda, prof. SGGW. Badania zostały przeprowadzone w Katedrze Nauk Przedklinicznych Instytutu Medycyny Weterynaryjnej.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa doktorska mgr inż. Michaliny Bartak została przygotowana w języku polskim, obejmuje 68 stron części opisowej oraz kopie publikacji składających się na rozprawę doktorską. Praca ma spójną oraz logiczną strukturę. Przedstawione słowo wstępne składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu skrótów, wstępu uzupełnionego o uzasadnienie podjęcia tematu, opisu celu i zakresu pracy oraz hipotez badawczych, opisu metodyki, wyników badań z prac stanowiących podstawę rozprawy, dyskusji, podsumowania uzupełnionego o wnioski oraz bibliografii.

Ocena merytoryczna

Koronawirusy od wielu lat pozostają przedmiotem badań. Przed rokiem 2003 postrzegane były jako patogeny o stosunkowo niewielkim znaczeniu dla medycyny, powodujące (podobnie jak wiele innych patogenów) przeziębienia o łagodnym

przebiegu. Wraz z pojawieniem się wirusa SARS-CoV w 2002/2003 roku o śmiertelności około 10% i wysokiej transmisyjności, ten obraz drastycznie się zmienił; badania wykazały, że rodzina koronawirusów była mocno niedoceniana zarówno jeżeli chodzi o patogenność, jak i liczbę gatunków wśród ludzi i zwierząt. Co więcej, prowadzone badania jasno pokazały zdolność koronawirusów do przekraczania bariery gatunkowej. Te obserwacje potwierdziły się w 2012 roku, kiedy odkryto, że na półwyspie arabskim pojawił się wśród wielbłądów koronawirus MERS-CoV. Patogen ten co prawda nie przenosi się efektywnie między ludźmi, jednak dochodzi do zakażeń odzwierzęcych, które charakteryzuje się bardzo wysoką śmiertelnością. Świadomi tego zagrożenia, po kolejnej dekadzie doświadczyliśmy pierwszej pandemii wywołanej przez wirus SARS-CoV-2.

Wzrost zrozumienia znaczenia koronawirusów przyniósł ze sobą również lepsze zrozumienie patogenezы zakażenia. Chociaż już wiele lat wcześniej pojawiały się doniesienia o chorobie Kawasaki u dzieci zakażonych koronawirusem NL63, a badania pokazywały obecność RNA sezonowych koronawirusów w tkance mózgowej, to dopiero badania kliniczne i laboratoryjne na SARS-CoV-2 wykazały, że również u ludzi wirusy te mają właściwości neurotropowe i zakażenie może mieć znacznie poważniejsze konsekwencje niż tylko przeziębienie.

Przedstawiona do oceny praca dotyczy dwóch zwierzęcych koronawirusów, które wykazują właściwości neurotropowe. Chociaż nie stanowią one zagrożenia dla człowieka, stanowią wygodne modele badawcze pozwalające na lepsze zrozumienie podstaw molekularnych naszych obserwacji klinicznych.

Celem przedłożonej pracy doktorskiej była analiza wpływu dwóch wirusów gryzoni, MHV (mysi wirus zapalenia wątroby) oraz SDAV (wirus sialodakryoadenitis szczurów) na komórki pochodzące z ośrodkowego układu nerwowego, astrocyty, komórki gleju oraz neurony. Przedstawiona praca została przygotowana w oparciu o cztery publikacje naukowe opublikowane w czasopismach *Viruses* (MDPI; praca przeglądowa), *BMC Veterinary Research* (Biomed Central), *International Journal of Molecular Sciences* (MDPI) oraz *Cells* (MDPI). Wszystkie te czasopisma są recenzowane i uwzględniane w międzynarodowych bazach danych, jednak obiektywnie rzecz biorąc są uznawane za periodyki o średniej jakości.

Wstęp teoretyczny przedłożonej pracy opisuje rodzinę koronawirusów, ze szczególnym uwzględnieniem historii naturalnej ludzkich koronawirusów oraz dosyć ogólnikowo opisuje koronawirusy uwzględnione w pracy. W rozdziale dotyczącym celów szczegółowo opisano cele badawcze, precyzując je nieco technicznie, zgodnie ze schematem „zbadanie mechanizmów”, „określenie profilu cytokin” oraz „wpływ zakażenia na”.

Niezależnie od mojej oceny samych czasopism, prace prezentują wysoką jakość i wnoszą wartość merytoryczną do dziedziny.

W pierwszej pracy pt.: „SDAV, the Rat Coronavirus—How Much Do We Know about It in the Light of Potential Zoonoses” (praca przeglądowa) przedstawiono obszerną charakterystykę wirusa SDAV jako przedstawiciela betakoronawirusów z podrodzaju Embecovirus. Autorzy opisują historię odkrycia SDAV w latach 60., jego tropizm tkankowy do gruczołów ślinowych, łzowych i dróg oddechowych, a także obraz kliniczny obejmujący obrzęk ślinianek, zapalenie spojówek, wydzielinę o charakterystycznym zabarwieniu oraz powikłania prowadzące do zmian w obrębie rogówki. Szczegółowo przedstawiono strukturę wirionu, rolę białek S, E, M, N i HE, jak również proces replikacji, włączając w to proces replikacji nieciągłej i powstawaniem kompleksu replikacyjnego. Cennym elementem pracy jest opisanie podobieństw między SDAV a innymi koronawirusami oraz dyskusja na temat transmisji międzygatunkowej tych gatunków.

W drugiej pracy pt. „Neurons cytoskeletal architecture remodeling during the replication cycle of mouse coronavirus MHV-JHM: a morphological in vitro study” autorka skupiła się na wpływie zakażenia neurotropowym szczepem koronawirusa mysiego MHV-JHM na cytoskielet zakażonych neuronów. Autorzy wykazali, że wirus replikuje w hodowlach pierwotnych neuronów, a w trakcie zakażenia dochodzi do dynamicznych zmian w architekturze filamentów aktynowych i mikrotubul. Zaobserwowano kondensację filamentów w warstwie korowej cytoplazmy, tworzenie struktur pierścieniowych oraz obecność antygenów wirusowych w długich filopodiach i strukturach nanorurek, co autorzy interpretują jako dowód na ich wykorzystanie do transportu wirionów między komórkami. Szczególnie istotne było

wykazanie, że MHV wykorzystuje mikrotubule do transportu wewnątrzkomórkowego, a zaburzenie ich organizacji przez inhibitory, takie jak noskapina czy nokodazol, prowadziło do znaczącego spadku replikacji wirusa.

W trzeciej pracy, pt.: „ATPase Valosin-Containing Protein (VCP) Is Involved During the Replication and Egress of Sialodacryoadenitis Virus (SDAV) in Neurons” autorka pokazuje, że wirus SDAV replikuje w pierwotnych neuronach mysich, a w jego cyklu replikacyjnym rolę pełni ATP-aza VCP/p97. W pracy pokazano, że zakażenie prowadzi do pojawienia się efektu cytopatycznego w neuronach, włączając w to powstawanie syncytiów, ognisk litycznych i spadek konfluencji komórek. Jednocześnie, nie wszystkie komórki ulegały infekcji litycznej. Analiza wykazała stopniowy wzrost ekspresji białka nukleokapsydu SDAV w czasie. Pokazano również, że poziom ATPazy wzrasta podczas zakażenia, a analiza konfokalna wykazała kolokalizację antygeny wirusowego z ATPazą. Zastosowanie inhibitora Eeyarestatyny I (EerI), który blokuje funkcję ATPazy VCP/p97, skutkowało ograniczeniem replikacji i wyraźnym zmniejszeniem miana wirusa. Ponadto obserwowano lokalizację białek wirusowych w okolicy błony komórkowej zamiast ich transportu wzdłuż wypustek neuronalnych, co sugeruje według autorki, że VCP uczestniczy w składaniu i uwalnianiu wirionów.

W pracy czwartej pt.: „Cytokine Profile Analysis During Sialodacryoadenitis Virus and Mouse Hepatitis Virus JHM Strain Infection in Primary Mixed Microglia and Astrocyte Culture—Preliminary Research” autorka analizuje produkcję cytokin oraz innych czynników związanych ze stanem zapalnym przez neurony zakażone wirusem SDAV. Praca pokazuje, że zakażenie skutkuje znacznym wzrostem ekspresji prozapalnych cytokin, w tym IL-6, TNF- α i IFN- β . Autorka zwraca uwagę na indukcję ekspresji chemokin odpowiedzialnych za rekrutację leukocytów, takich jak CXCL10 czy CCL5 i sugerują, że w związku z tym SDAV ma potencjał do wywoływania stanu zapalnego w obrębie OUN.

Chociaż pozytywnie oceniam pracę, zarówno jeżeli chodzi o wstęp, który dostarcza nam kompleksowe wprowadzenie do tematu, jak i same prace naukowe, mam kilka pytań i uwag dotyczących meritum pracy.

1. Brakuje mi szczegółowego opisu molekularnego badanych koronawirusów zwierzęcych. O ile praca przeglądowa opisuje szczegółowo naturę wirusa SDAV, wirus MHV wydaje się być nieco zaniedbany. Nie jest to pytanie, ale jedynie uwaga i proszę ją pominąć w odpowiedziach.
2. Jak wspomniano powyżej, cele pracy zdefiniowano nieco „technicznie”. Bardzo proszę o redefinicję celów, tak aby odpowiadały one na pytanie „po co?”.
3. W pracy wykorzystano komórki pierwotne pobrane od myszy. Na dużą pochwałę zasługuje wykorzystanie tego modelu zamiast linii komórkowych. Jednakże, czy w kontekście analizy wpływu wirusów na cytoszkielet oraz odpowiedź tkanki na zakażenie nie warto byłoby rozważyć zastosowanie organoidów OUN myszy zamiast hodowli 2D? W jaki sposób monitorowano zróżnicowanie (i naturalne zmiany w zróżnicowaniu w czasie) komórek w pracy czwartej?
4. W jaki sposób wielokrotne pasażowanie wirusów (np. szczep JHM MHV) wpływa na wartość uzyskanych wyników?
5. W pracy drugiej, z obecności antygenów wirusowych w strukturach nanorurek autorka wysnuła wniosek, że wirus ten może przenosić się pomiędzy komórkami z pominięciem naturalnego procesu pączkowania, bezpośrednio pomiędzy komórkami. Jest to mechanizm opisany dla innych wirusów, jednak moją wątpliwość budzi przedstawiona interpretacja. Nie przedstawiono migracji w czasie kapsydów z RNA ani nie przedstawiono dowodów na transfer RNA wirusowego przez te struktury. Czy przedstawione dowody faktycznie można interpretować tak jednoznacznie?
6. W pracy drugiej przedstawiono interpretację, że cytoszkielet jest elementem niezbędnym do transportu wirusów do miejsca replikacji. Jednakże, proces dowodowy opierał się na analizie ilościowego RT-qPCR, co ma swoje ograniczenia. Po pierwsze, czy zakażenie było prowadzone w

pojedynczym cyklu zakażenia, czy w wielu cyklach (24 h może oznaczać wiele cykli)? W drugim przypadku można również wnioskować, że cytoskielet jest niezbędny w procesie fuzji wirus-komórka oraz praktycznie na każdym etapie zakażenia, łącznie z dostępnością receptorów na powierzchni komórek. W jaki sposób autorka wyklucza możliwość, że hamujący efekt wynikał z zablokowania transportu wirusów potomnych poza komórkę?

7. W pracy trzeciej pojawia się sugestia, że ATPaza CVP/p97 pełni istotną rolę w cyklu replikacyjnym wirusa. Moje pytanie dotyczy faktu, czy faktycznie ten proces ma charakter przyczynowo-skutkowy, czy raczej ATPaza (która uczestniczy w kontroli jakości i kierowania na ścieżkę degradacji białek nieprawidłowo sfałdowanych) kolokalizuje z białkami wirusowymi; taka kolokalizacja, ze względu na charakter białek wirusowych i częste problemy z fałdowaniem nie byłaby specjalnie zaskakująca. Zastosowanie inhibitora ATPazy sugeruje faktyczną rolę tego enzymu, jednak pamiętając o ograniczonej specyficzności inhibitorów, bez zastosowania metod komplementarnych (np. CRISPR/Cas, siRNA) wykazanie takiego związku jest według mnie bardzo trudne.
8. Tytuł pracy „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” wydaje mi się nieco nadmiarowy, uwzględniając, że tylko w pracy czwartej *de facto* wykorzystywano ko-kulturę, jednak bez analizy zróżnicowania komórek oraz składu populacji.

Ocena edytorska

Praca została napisana poprawnym językiem naukowym i w sposób przyjemny wprowadza czytelnika w zagadnienie. Grafiki zostały przygotowane w sposób profesjonalny i klarownie opisane. Konstrukcja pracy prawidłowa, bibliografia obszerna i aktualna.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr inż. Michaliny Marii Bartak stanowi wartościowy wkład w rozwój dyscypliny, a przeprowadzone badania są wysokiej jakości i mają charakter aplikacyjny. Autorka wykazała się zarówno kompetencjami eksperymentalnymi, jak i dobrą znajomością literatury naukowej.

Na podstawie przeprowadzonej oceny stwierdzam, że praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnioskuje o dopuszczenie mgr inż. Michaliny Bartak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Z wyrazami szacunku,

Signed by /
Podpisano przez:



Krzysztof Antoni
Pyrc

Krzysztof Pyrc

Date / Data:
2025-09-30 23:37