



**KATEDRA  
I ZAKŁAD  
BIOLOGII  
Z GENETYKA**

**Katedra i Zakład Biologii z Genetyką**  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
ul. W. Chodźki 4A 20-093 Lublin, tel. 81 448 7232

**Kierownik:**  
**Prof. dr hab. n. farm. Anna Bogucka –Kocka**

Lublin 2.04.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Marka Kowalczyka pt.:**  
**„Polimorfizm molekularny wirusa choroby aleuckiej**  
**w populacji norki amerykańskiej (*Neovision vision*) oraz w jej środowisku**  
**hodowlanym w Polsce”**

Wykonanej w Zakładzie Genetyki Ogólnej i Molekularnej, Instytutu Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Wydziału Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, pod kierunkiem promotora dr hab. Andrzeja Jakubczaka prof. uczelni i promotora pomocniczego dr Beaty Horeckiej. Choroba aleucka nerek (AMD) wywoływana przez parwowirusa z rodzaju *Amdovirus* jest od wielu lat zarówno w Polsce jak i na świecie niezwykle istotnym czynnikiem wpływającym na obniżenie parametrów rozrodczych nerek takich jak ilość młodych w miocie, obniżenie ich wagi urodzeniowej oraz powodującym utratę ciąży. Bezpośrednim efektem rozprzestrzeniania się choroby aleuckiej jest utrata dochodów i rentowności ferm hodowlanych. Brak szczepionki zmusza do podjęcia badań w kierunku zwiększenia efektywności wczesnej diagnostyki i opracowania procedur umożliwiających efektywną profilaktykę choroby.

Tematyka pracy wpisuje się w aktualne zagadnienia badawcze związane z rozwojem i poszerzaniem metod diagnostycznych choroby aleuckiej, epidemiologią wirusa AMD, oraz charakterystyką molekularną wirusa.

Cele przedstawionej do oceny pracy to: określenie skali epidemiologii wirusa AMD w populacji nerek hodowlanych oraz w ich środowisku hodowlanym w Polsce, przygotowanie charakterystyki molekularnej izolatów wirusa powodujących chorobę o przebiegu klinicznym i subklinicznym oraz zbadanie jaki jest wpływ immunostymulacji *methisoprinolem* na parametry hodowlane na fermie trwale zakażonej wirusem AMD. Badania ujęte w pracy wykonano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach nr zgody 30/2010.

Cele pracy są sformułowane przejrzysto a kolejne etapy badań powiązane są ze sobą przyczynowo-skutkowo. Należy w tym miejscu podkreślić, że przedstawiona do oceny praca jest obszerna i zawiera dużą ilość danych będących rezultatem dobrze przemyślanego i przygotowanego eksperymentu badawczego. Zastosowane w pracy techniki badawcze świadczą o dużej biegłości analitycznej w obszarze metod stosowanych w genetyce i biologii molekularnej.

Wyniki badań będących podstawą dysertacji doktorskiej co należy podkreślić zawarte są aż w 7 publikacjach o łącznym IF=9,058. A udział Doktoranta w publikacjach jest bardzo rzetelnie określony na 55%. Omówienie wyników badań w sposób jasny i klarowny przedstawione jest na 24 stronach maszynopisu.

W pierwszym etapie pracy Autor ocenił zmienność wirusa AMD pomiędzy fermą położoną w północno-wschodniej części Polski a fermą z zachodniej części Polski. W obu fermach u około 60% zwierząt stwierdzono trwałe zakażenie wirusem AMD a choroba przebiegała z objawami subklinicznymi. Materiał do badań pobierano ze śledziony i węzłów chłonnych. Uzyskane wyniki wykazały wysokie zróżnicowanie wirusa w obrębie badanych ferm. Autor przeanalizował wpływ zmian w sekwencji nukleotydowej na sekwencję aminokwasów w białku VP2. Na fermie z północno-wschodniej części Polski (ferma A) zidentyfikowano obecność 4 genotypów wirusa AMD, natomiast na fermie z zachodniej Polski (ferma B) wyróżniono 5 genotypów. Porównanie otrzymanych wyników z danymi dostępnymi w bazie NCBI pozwoliło na zidentyfikowanie czterech zmian które nie występowały w zdeponowanych sekwencjach. Autor po raz pierwszy wykazał obecność zmian w genomie wirusów z fermy B skutkujących zamianą izoleucyny na leucynę w pozycji 325 (325I>L), zamianą asparaginy na histydynę w pozycji 332 (332N>H), zamianą kwasu glutaminowego na lizynę w pozycji 349 (349E>K), oraz w jednym z izolatów wirusa z fermy A wykazał obecność dwóch po raz pierwszy opisanych zmian (241D>I oraz 349E>K). Autor wykazał również istnienie 21 zmian pomiędzy sekwencją szczepu referencyjnego (NC\_001662.1-AMDV-G) a uzyskanymi genotypami z czego 8 występowało w regionie hiperzmiennym. Dla izolatów z fermy B charakterystyczne były zmiany 172F>Y, 324L>I, 328Q>E, 332N>H, których nie zaobserwowano w próbach z fermy A. W przypadku prób z fermy A zmianą występującą w każdym izolacie, różnicującą od izolatów z fermy B była 325I>V.

Autor wykonał również ilościowe oznaczenie liczby kopii wirusa metodą qPCR i wykazał, że w przypadku nerek z fermy B (przebieg subkliniczny choroby) liczba kopii utrzymywała się na poziomie  $10^3$ , natomiast w przypadku fermy A (przebieg kliniczny choroby) była o dwa rzędy wielkości wyższa i wynosiła  $10^5$ .

W kolejnym etapie pracy Autor podjął się oceny zróżnicowania wirusa AMDV pomiędzy populacją wolno żyjącą a hodowlaną. Norki hodowlane pozyskano z ferm w których występuje trwała subkliniczna postać choroby aleuckiej u 60% badanych zwierząt a norki wolno żyjące od myśliwych prowadzących legalny odłów zwierząt. Materiał do badań pobrano ze śledzion. Analiza sekwencji kodującej fragment białka VP2 wykazała znaczne zróżnicowanie pomiędzy zwierzętami hodowlanymi a wolno żyjącymi. W populacji zwierząt hodowlanych wyróżniono pięć, natomiast u osobników żyjących wolno cztery warianty genetyczne wirusa. Autor wykazał, że podobieństwo pomiędzy izolatami wirusa z obu grup wynosiło 94%, jednocześnie wykazał obecność 35 różnic w sekwencji nukleotydowej, spośród których 20 dotyczyło pojedynczych zmian w kodonie, 6 powodowało zmianę dwóch nukleotydów w kodonie, a 9 prowadziło do zmian sekwencji całych kodonów. Autor wykazał, że znalezione zmiany w sekwencji nukleotydowej powodowały powstanie 9 zmian w sekwencji aminokwasowej białka VP2. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że dla wariantów wirusa występującego u zwierząt hodowlanych charakterystyczne są dwa polimorfizmy: N331H, Y359M, natomiast polimorfizm I451V występuje wyłącznie u zwierząt dzikich. Autor wykazał również obecność specyficznych różnicujących obie grupy polimorfizmów w regionach oddziałujących z przeciwciałami, co może przekładać się na zróżnicowaną wirulencję i może tłumaczyć fakt utrzymywania się wirusa w populacjach zwierząt wolno żyjących. Autor wykazał wzajemne podobieństwo zarówno w obrębie wariantów fermowych wirusa jak i w obrębie wariantów wirusa zwierząt wolno żyjących.

Wyniki analizy filogenetycznej przeprowadzonej przez Autora wskazują, że warianty infekujące osobniki wolno żyjące, zajmują osobną gałąź w obrębie tego samego kladu co warianty infekujące zwierzęta hodowlane.

W kolejnym etapie badawczym Autor w celu przeprowadzenia charakterystyki molekularnej wirusa na polskich fermach wykonał poszerzoną analizę zmienności obejmującą 27 ferm. Wyniki badań potwierdziły polimorfizm populacji wirusa AMD na terenie Polski, co może wynikać z wielokrotnego wprowadzenia wirusa z różnych źródeł. Przeprowadzona przez Autora analiza filogenetyczna wykazała obecność czterech głównych kladów w polskiej populacji AMDV. Grupa I w skład której wchodzi warianty z województwa zachodniopomorskiego, wykazuje podobieństwo przekraczające 99% w stosunku do wariantów izolowanych w Grecji i Holandii. Grupa II w skład której wchodzi warianty z Polski wschodniej, różnią się znacząco w stosunku do zasobów bazy NCBI, co może wskazywać na ich lokalny i endemiczny charakter. Niejednorodna grupa III została podzielona na dwie podgrupy. Do podgrupy IIIA wchodzi warianty z okolic Wielkopolski, które wykazywały

około 99% podobieństwo do wariantów AMDV izolowanych na terenie Polski w roku 2016, oraz do izolatów z Holandii. Warianty z grupy IIIB były najbardziej zbliżone do izolatów z Holandii (ponad 97% podobieństwa). Grupę IV stanowiły warianty wirusa ADM izolowane z okolic Podkarpacia i Małopolski, które wykazywały ponad 97% podobieństwa do sekwencji wirusa izolowanego w Polsce i na Litwie w roku 2016.

W następnym etapie Autor wykonał badania mające na celu ocenę ładunku wirusowego zarówno w poszczególnych tkankach jak i w środowisku. W tym celu pobrany został materiał ze śledzion, krew i wymazy środowiskowe z ferm z dodatnimi wynikami CIEP. We wszystkich próbach krwi w śledzionach i w 69% wymazów środowiskowych potwierdzono obecność materiału genetycznego wirusa. Wyniki analizy ilościowej (qPCR) wykazały, że najwyższa ilość materiału genetycznego wirusa znajduje się w śledzionie. Potwierdzenie obecności wirusa w środowisku fermowym potwierdza konieczność badania nie tylko zwierząt, ale także środowiska hodowlanego które staje się rezerwuarem wirusa i sprzyja rozprzestrzenianiu się choroby z udziałem wektorów takich jak owady, ubrania pracowników fermy, pojazdy odwiedzające fermy.

Autor wykazał również na przykładzie doświadczenia z użyciem *methisoprinolu*, że stosowanie związków immunostymulujących wpływa znacząco na zmniejszenie ilości kopii wirusa w tkankach limfoidalnych u zwierząt leczonych, w porównaniu do grupy kontrolnej (nie leczonej). Uzyskane przez Autora wyniki badań wykazały, że efektem obniżonej replikacji wirusa i działania immunostymulującego *methisoprinolu* jest zwiększenie liczebności miotu i wyższa masa zwierząt.

Opracowana przez Autora metoda duplex PCR przyczyniła się do wyeliminowania wyników fałszywie ujemnych i umożliwiła detekcję wirusa zarówno w próbach biologicznych jak i środowiskowych na poziomie  $10^2$  kopii.

Z obowiązku Recenzenta chciałabym jedynie powiedzieć, że odczuwam w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej brak jasnego i klarownego opisu materiału badawczego i metod badawczych zastosowanych w pracy. Recenzent musi się domyślać czy zwierzęta które były użyte do określenia zmienności wirusa pomiędzy fermami z różnych części Polski i zwierzęta które były użyte do oceny zróżnicowania wirusa AMDV pomiędzy populacją wolno żyjącą a hodowlaną to są te same zwierzęta pomimo różnej liczby zwierząt użytych do doświadczenia czy nie są to te same osobniki? Jednocześnie chciałabym zauważyć, że Autor w moim odczuciu zbyt skromnie podkreślił a właściwie nie podkreślił nowatorstwa uzyskanych przez siebie wyników. Przedstawione uwagi zupełnie nie umniejszają wartości pracy a mają przyczynić się jedynie do dyskusji.

Doktorant w pełni zrealizował postawione sobie w pracy cele. Uzyskane wyniki znacząco zwiększają wiedzę na temat epidemiologii choroby aleuckiej, zróżnicowania wirusa AMDV oraz wpływu związków immunostymulujących na poziom wirerii oraz zwiększenie liczebności miotu nerek hodowlanych.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Marka Kowalczyka stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego przez Autora, zawiera elementy nowości naukowej i potwierdza Jego dużą wiedzę teoretyczną w reprezentowanej dyscyplinie naukowej. Praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i wnioskuje o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę aktualność podjętej przez Autora tematyki badawczej, zróżnicowany warsztat badawczy, wielką liczbę uzyskanych wyników i jakość ich opracowania, wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Marka Kowalczyka.

Kierownik  
Katedry i Zakładu Biologii i Genetyki  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
  
prof. dr hab. n. farm. Anna Błaszczak-Kocka  
Specjalista Leku Roślinnego