

dr hab. Konrad Ocalewicz, prof. UG
Zakład Biologii i Ekologii Morza,
Wydział Oceanografii i Geografii,
Uniwersytet Gdański

Gdynia, 12.02.2021 r.

RECENZJA

Pracy doktorskiej mgr Elżbiety Pietrzak

pt. „Wpływ galaktooligosacharydów na modulację ekspresji genów związanych z układem immunologicznym ptaków i ryb.”

Recenzowana praca doktorska dotyczy oszacowania zmian ekspresji wybranych genów związanych z układem immunologicznym spowodowanych suplementacją prebiotykiem GOS (galaktooligosacharydy) kur i karpia. W przypadku tego pierwszego gatunku eksperyment zakładał także zbadanie drugiego czynnika jakim jest stres cieplny w formie ostrej i chronicznej. Wyniki badań zostały zamieszczone w dwóch współautorskich artykułach naukowych; *Splenic gene expression signatures in slow-growing chickens stimulated in ovo with galactooligosaccharides and challenged with heat (Artykuł 1)* i *Innate immune responses of skin mucosa in common carp (Cyprinus carpio) fed a diet supplemented with galactooligosaccharides (Artykuł 2)*, opublikowanych w czasopiśmie *Animals* (IF= 2.323). Tematyka recenzowanej pracy jest aktualna i ważna tak w kontekście hodowli zwierząt jak i samych badań prowadzonych na poziomie molekularnym.

Rozprawa doktorska składa się z dwóch części. W pierwszej z nich doktorantka zawarła podstawowe informacje dotyczące gatunków zwierząt będących obiektem badań w niniejszej pracy (kury i karpia), opisała międzygatunkowe różnice w budowie i funkcjonowaniu układu immunologicznego i odporności oraz przedstawiła jaki wpływ na zdrowie i mikrobiotę jelitową zwierząt mają prebiotyki, ze szczególnym uwzględnieniem galaktooligosacharydów (GOS). Kolejnymi elementami tej części pracy doktorskiej jest wykaz artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej oraz dosyć pobieżne uzasadnienie spójności tematycznej tegoż cyklu. Uważam, że praca byłaby bardziej spójna gdyby dotyczyła wpływu badanego prebiotyku na ekspresję wybranych genów, na przykład u kilku gatunków ryb hodowlanych lub kilku różnych gatunków lub ras/linii ptaków. Dalej w tej części rozprawy doktorantka przedstawia hipotezy naukowe i cele badawcze. O ile hipotezy i cel ogólny pracy są sformułowane prawidłowo, to forma w jakiej przedstawiono cele szczegółowe budzi pewne wątpliwości, bo czy **analiza** molekularna podstaw odpowiedzi immunologicznej jest rzeczywistym celem badań czy raczej drogą do uzyskania wyników pozwalających na weryfikację postawionych hipotez? Na kolejnych stronach rozprawy doktorantka przedstawiła założenia dwóch eksperymentów mających na celu określenie wpływu GOS na ekspresję wybranych genów związanych z odpowiedzią immunologiczną u

kur i karpki. W przypadku tego pierwszego gatunku eksperyment był prowadzony także w warunkach stresu cieplnego, a analiza molekularna dotyczyła dodatkowo badania ekspresji genów powiązanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny. Zastanawiam się, dlaczego w przypadku karpki nie zaplanowano wariantów z podchowem ryb w wodzie o różnej temperaturze. Tak przygotowany eksperyment pozwoliłby na uzyskanie większej ilości danych, a obie publikacje tworzyłyby bardziej spójny cykl. Szkoda też, że w obu publikacjach skoncentrowano się tylko na badaniach ekspresji genów. Myślę, że równolegle warto było przeprowadzić badania tempa wzrostu, kondycji oraz fizjologicznej odpowiedzi na stres u zwierząt, którym podawano GOS i które były hodowane w zmiennych warunkach temperaturowych.

Wyniki prowadzonych badań przedstawiono w tej części rozprawy w formie opisowej, co niekoniecznie było najlepszym rozwiązaniem, gdyż taka ich prezentacja jest miejscami mało przejrzysta. Zdecydowanie lepiej przedstawiono wyniki badań w artykułach naukowych składających się na cykl publikacji. Następnie, doktorantka dokonała analizy uzyskanych wyników w kontekście dostępnej wiedzy dotyczącej stosowania GOS w hodowli kurcząt i karpki, odpowiedzi na stres cieplny w przypadku kur oraz molekularnej odpowiedzi na suplementację prebiotykiem. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła doktorantce wysnuć wnioski i zweryfikować założone hipotezy badawcze. Szczególnie ciekawie wypadają wyniki dotyczące podania *in ovo* GOS kurczętom narażonym na stres cieplny. Chroniczny stres cieplny powoduje aktywację odpowiedzi prozapalnej i przeciwzapalnej oraz wyzwała tak zwane zapalenie oksydacyjne u kur. Natomiast, prebiotyk GOS łagodzi tenże stan oraz obniża odpowiedź humoralną na czynnik stresowy. W przypadku ryb, suplementacja GOS powoduje między innymi podwyższenie ekspresji genów związanych z ochroną przeciwwirusową i antybakteryjną.

Cytowane w pierwszej części prace naukowe są zebrane w spisie literatury, po którym to spisie możemy zapoznać się ze streszczeniami rozprawy przygotowanymi w języku polskim i angielskim. Szczegółowe wyniki badań, gruntowna ich analiza i dyskusja oraz płynące z niej wnioski są przedstawione w drugiej części pracy, w dwóch artykułach naukowych.

Artykuł 1: *Splenic gene expression signatures in slow-growing chickens stimulated in ovo with galactooligosaccharides and challenged with heat*

Celem pierwszej publikacji była ocena wpływu GOS podanego *in ovo* na ekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną oraz odpowiedzią na stres w śledziona wolno-rosnących kur, narażonych na stres cieplny (ostry i chroniczny). Hipoteza naukowa jaka towarzyszyła tym badaniom zakładała, że genetycznie różne od brojlerów kury, którym podano *in ovo* GOS będą wykazywały zwiększoną odporność na szok cieplny. Z opisu przedstawiającego założenia doświadczenia i opis badanego materiału pośrednio wynika, że część eksperymentu związaną z podawaniem GOS *in ovo*, inkubacją jaj, wychowem kurcząt w warunkach, które zakłada eksperyment (stres cieplny) oraz pobieraniem materiału do izolacji RNA przeprowadzono we Włoszech. Proszę o doprecyzowanie tej części pracy, gdyż nie jest ona jasno sformułowana w publikacji.

Część „podchowowa” eksperymentu została tak zaprojektowana by sprawdzić wpływ stresu cieplnego ostrego i chronicznego na kurczęta, z których część otrzymała GOS. Brakuje mi natomiast zaplanowania i przeprowadzenia badań kondycji kurcząt w eksperymencie; tempa wzrostu, jakości mięsa, efektywności wykorzystania paszy i testów pozwalających oszacować poziom stresu oksydacyjnego u badanych zwierząt. Założenia badań ekspresji genów są prawidłowe, choć niemal identyczne podejście i podobne panele badanych genów wykorzystano w poprzedniej pracy firmowanej przez współautorów tej publikacji (Sławinska i in. 2019). Panele te zawierały geny związane z odpowiedzią immunologiczną (geny

interleukiny (*IL-* 2, 4, 6, 10, 12*p*40, 17) (panel 1) oraz geny związane z odpowiedzią na stres (geny dwóch białek szoku cieplnego – HSP25 i HSP 90, geny BAG białka opiekuńczego, katalazy *CAT* i dysmutazy ponadtlenu SOD1 (panel 2).

Uzyskane wyniki zostały w przejrzysty sposób przedstawione w formie wykresów ułatwiających czytelnikowi zapoznanie się z nimi. Z wykresów tych wynika, że stres chroniczny powodował u badanych kurcząt wzrost ekspresji genów *IL-10*, *IL-12p40* i genów *SOD* i *CAT*. W grupie podlegającej suplementacji GOS i poddanej na działanie ostrego stresu cieplnego zaobserwowano znaczące obniżenie ekspresji jedynie w przypadku genu interleukiny 4 (*IL-4*), natomiast w warunkach stresu chronicznego, takiej reakcji na czynnik stresowy uległy geny nie tylko *IL-4*, ale także *IL-12p40*, *CAT* i *SOD*. Wyniki te są interesujące i pozwalają na zweryfikowanie hipotezy badawczej i założonych celów naukowych. W tym miejscu ponownie zaznaczę, że praca byłaby merytorycznie pełniejsza, gdyby przeprowadzono także analizy dotyczące kondycji kurcząt oraz przebadano je pod kątem fizjologicznej odpowiedzi na stres.

Uzyskane wyniki badań ekspresji genów u kurcząt podchowiwanych w optymalnych warunkach temperaturowych oraz poddanych na działanie chronicznego i ostrego stresu cieplnego, w obecności GOS lub bez podania *in ovo* tego prebiotyku pokazały, że dodanie prebiotyku GOS łagodzi odpowiedź komórkową na czynnik stresowy na poziomie ekspresji genów. Stres cieplny wywołuje pojawienie się stresu oksydacyjnego i nadmiar reaktywnych form tlenu. Organizm odpowiada na taki stan min. przy pomocy enzymatycznych mechanizmów antyoksydacyjnych takich jak na przykład dysmutaza ponadtlenu (SOD), katalazy (*CAT*) czy glutation. Geny kodujące SOD i *CAT* uległy wzmożonej ekspresji u kurcząt poddawanych na działanie chronicznego stresu cieplnego, ale podanie *in ovo* GOS znacząco ekspresję tych genów obniżało. Doktorantka sugeruje w tej publikacji, że brak reakcji genów białek szoku cieplnego na stres termiczny u badanych kurcząt wskazywać może, że rasa wolno-rosnących kur badanych w tym doświadczeniu jest w pewnym stopniu odporna na temperatury nieco wyższe od optymalnych. Do tego miejsca rozdział Dyskusja w zasadzie nie wzbudza jakichś większych wątpliwości. Takowe pojawiają się podczas lektury ostatniego akapitu tej części artykułu. W tej części doktorantka przedstawia wyniki dotyczące wpływu stresu temperaturowego i suplementacji GOS na masę ciała badanych kur. Dziwi to szczególnie, że w rozdziale Wyniki nie ma o tym mowy. Sprawa wyjaśnia się nieco, kiedy dowiadujemy się, że są to nieopublikowane informacje uzyskane od jednego ze współautorów artykułu. Uważam, że ten element publikacji nie powinien się w niej znaleźć.

Artykuł 2: *Innate immune responses of skin mucosa in common carp (Cyprinus carpio) fed a diet supplemented with galactooligosaccharides*

Celem badań, których wyniki przedstawiono w drugiej publikacji składającej się na cykl artykułów, była analiza wpływu prebiotyku GOS podawanego w paszy na ekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną w błonie śluzowej skóry karpia (*Cyprinus carpio*). Jak już wskazałem wcześniej, analiza nie powinna być celem, a pewną proceduralną czynnością pomagającą zweryfikować hipotezę lub hipotezy naukowe. Niestety w publikacji tej nie ma jasno przedstawionej hipotezy badawczej przez co tak postawionemu celowi brakuje naukowej ważkości.

Kolejne akapity rozdziału Wstęp (Introduction) dotyczą min. budowy i funkcji skóry u ryb, w tym tkanki limfatycznej związanej ze skórą (SALT – skin-associated lymphoid tissue) (1), mikrobioty skóry (2) i prebiotyków (w tym tytułowego GOS) podawanych rybom w celu modulowania mikrobioty jelitowej, co jak pisze doktorantka poprawia tempo wzrostu, wpływa na parametry hematologiczne oraz ekspresję genów związanych z odpornością (3). Ostatni akapit tej części pracy dotyczy poprawy odporności ryb w wyniku suplementacji immunostymulującymi dodatkami (prebiotyki, zioła, probiotyki, etc).

Karpom z grupy eksperymentalnej w opisanym w tym artykule doświadczeniu podawano karmę z dwu procentowym (2%) dodatkiem GOS. Autorka rozprawy nie przedstawiła dlaczego w doświadczeniu wybrano tylko taki wariant i dlaczego nie przetestowano pasz z inną zawartością badanego prebiotyku. Pewne światło na tak zaplanowany eksperyment rzuca artykuł opublikowany w 2017 roku przez Hoseinifar i in. w *Aquaculture Research* i dotyczący wpływu wybranych prebiotyków, w tym min. GOS na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i ekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną w nerce głowowej i jelicie karpia. W tejże publikacji autorzy wykorzystali właśnie 2% dodatek prebiotyku GOS. Do analizy ekspresji wybrano osiem ryb i wytypowano panel złożony z 16 genów kodujących komponenty związane z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną karpia takie jak gen białka c-reaktywnego, geny peptydów przeciw ustrojowych, cytokin, lektyn, lizozymu, mucyny, peroksydazy, katepsyn i oksydoreduktazy. Doktorantka w tym artykule sporo miejsca poświęciła na opis działań, które doprowadziły do wyłonienia genów referencyjnych wykorzystanych podczas analiz RT-qPCR. Docelowo wybrano gen beta aktyny i gen 40s s11. Pierwszy z tych genów był także wykorzystany w tym samym celu w pracy Hoseinifara i in (2017), o której wspomniałem powyżej.

Koncepcja i założenia eksperymentalne opisane w tej publikacji nie są więc zupełnie nowe. Co więcej wykorzystanie tylko jednego wariantu paszy z GOS (2%) oraz ograniczenie analiz do badań ekspresji wybranych genów z pominięciem analizy kondycji ryb, tempa wzrostu, itd. uważam za niepotrzebne ograniczenie ciekawie zapowiadającego się eksperymentu. Porównanie ekspresji genów u ryb karmionych paszą z GOS (1) i bez dodatku tego prebiotyku (2) wykazało u tych pierwszych wzrost ekspresji większości badanych genów, ale statystycznie istotne różnice zaobserwowano tylko w przypadku genu interferonu gamma i genu lizozymu G związanych odpowiednio z antywirusową i antybakteryjną odpowiedzią organizmu. Z kolei ekspresja genu CRP w tej grupie ryb była wyraźnie niższa. Graficzne przedstawienie tych wyników zdecydowanie ułatwia ich analizę. Niestety, ze względu na zachowawczo zaprojektowane doświadczenie, nie wiemy na co jeszcze przełożyła się suplementacja GOS u badanych karpia. Dyskusja dotycząca ekspresji genów u ryb, którym podaje się prebiotyki jest poprowadzona prawidłowo, a uzyskane wyniki potwierdzają immunomodulującą rolę GOS w przypadku karpia, których dieta zawiera 2% dodatek tego prebiotyku.

Udział doktorantki w przygotowanie obu publikacji do druku jest podobny i jak wynika z oświadczenia autorki rozprawy i informacji zawartej w obu publikacjach, dotyczył zaplanowania (wraz z innymi współautorami) eksperymentu pod kątem metodycznym (1), przeprowadzenia tej części eksperymentu, która dotyczyła badania ekspresji genów (2), samodzielnego przygotowanie draftu pracy (3) oraz przygotowania wraz ze współautorami wersji pracy przeznaczonej do druku (4). Oświadczenia współautorów potwierdzają taki udział doktorantki w pracach laboratoryjnych oraz podczas przygotowywania publikacji do druku.

Podsumowując, wyniki prowadzonych przez doktorantkę badań opublikowane w czasopiśmie naukowym *Animals* zostały uzyskane przy wykorzystaniu prawidłowo dobranych metod badawczych. Wnioski, które doktorantka wysnuła na podstawie przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych rezultatów mają swoje poparcie w części dyskusyjnej będącej integralną częścią obu artykułów stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej. Wnioski te są dobrze udokumentowane i zdefiniowane. Hipotezy badawcze zostały prawidłowo zweryfikowane w trakcie realizacji postawionych celów naukowych. Pewien niedosyt budzi ograniczona liczba badanych przez doktorantkę gatunków zwierząt oraz niejasny klucz ich wyboru (1), brak wariantów z wykorzystaniem stresu cieplnego w eksperymencie prowadzonym na karpkach (2), zastosowanie tylko jednej dawki GOS w

prowadzonych doświadczeniach (3) oraz ograniczenie prowadzonych badań tylko do szacowania ekspresji genów w odpowiedzi na podawanie prebiotyku GOS i stresu cieplnego z pominięciem analizy kondycji zwierząt (4). Mam nadzieję, że doktorantka ustosunkuje się do tych wątpliwości podczas dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek końcowy

Pomimo kilku zastrzeżeń, które przedstawiłem powyżej uważam, że recenzowana rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami). Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo przy Uniwersytecie Technologiczno-Przyrodniczym im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy o dopuszczenie mgr inż. Elżbiety Pietrzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Konrad Ocalewicz



