

Szczecin, dnia 9 lutego 2021 roku

dr hab. Adam Lepczyński, prof. ZUT
Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr inż. Elżbiety Pietrzak

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

zrealizowanej pod kierunkiem

dr hab. inż. Anny Sławińskiej, prof. uczelni

Podstawą wykonania recenzji jest pismo Pani dr hab. inż. Katarzyny Stadnickiej, prof. uczelni – Przewodniczącej Rady Naukowej dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy z dnia 15 grudnia 2020 roku (L.dz. WHiBZ/530/2020/131)

Ocena Formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Elżbiety Pietrzak wykonana została w formie cyklu publikacji opatrzonych wspólnym tytułem „*Wpływ galaktooligosacharydów na modulację ekspresji genów związanych z układem immunologicznym ptaków i ryb*”. Realizacja pracy doktorskiej odbywała się pod opieką promotorską Pani dr hab. inż. Anny Sławińskiej, prof. uczelni w Katedrze Biotechnologii i Genetyki Zwierząt, Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy.

Cykl publikacji stanowią dwa oryginalne artykuły naukowe opublikowane w czasopiśmie **Animals** w 2020 roku. Łączny współczynnik wpływu (*impact factor*) dla tych publikacji za rok opublikowania wynosi **4,646**. Sumaryczna wartość punktowa publikacji

według MEiN wynosi **200**. Czasopismo *Animals* skategoryzowane jest w wykazie czasopism naukowych, jako przynależne do dyscypliny zootechnika i rybactwo.

Ponadto, należy zwrócić uwagę, że ujęte w dysertacji doktorskiej prace naukowe przeszły proces recenzji, w których dokonano ich merytorycznej i formalnej oceny, przez przynajmniej dwóch niezależnych recenzentów. Pani mgr inż. Elżbieta Pietrzak jest pierwszym autorem obu artykułów naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, ponadto jej wkład w realizację doświadczeń w nich opisanych, a także opracowanie merytoryczne artykułów był znaczący. Potwierdza to deklarowany w oświadczeniach wysoki procentowy wkład w powstanie opracowań na poziomie 40 oraz 80%, a także opisany w nich udział Autorki.

Ocena rozprawy doktorskiej

Oceny rozprawy doktorskiej dokonano na podstawie nadesłanego egzemplarza. W strukturze pracy wyszczególniono następujące podrozdziały: Wstęp; Wykaz artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej; Uzasadnienie spójności tematycznej cyklu publikacji rozprawy doktorskiej; Hipoteza badawcza i cel badawczy; Materiał i metody badań; Wyniki; Dyskusja; Podsumowanie wyników i wnioski; Załączniki (obejmujący kopie manuskryptów prac wchodzących w cykl publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień; oświadczenie doktorantki oraz oświadczenia współautorów prac).

Podrozdział „Wstęp”, stanowiący przegląd literatury, przybliża wspólną drogę ewolucyjną gromad ryb kostnoszkieletowych oraz ptaków, a także charakteryzuje genomy obu gatunków zwierząt wykorzystanych jako modele w przeprowadzonych przez Doktorantkę badaniach. Następnie Doktorantka dokonuje syntetycznego opisu układu immunologicznego ryb kostnoszkieletowych i ptaków. Wskazując na istotny udział w odpowiedzi immunologicznej tkanki limfatycznej związanej ze skórą (SALT – ang. skin associated lymphoid tissue), uzasadniając tym samym podjęcie badań tego obwodowego kompartmentu układu odpornościowego. W następnej kolejności, doktorantka dokonuje syntetycznego przeglądu organizacji układu odpornościowego drobiu wskazując, poza centralnymi ośrodkami limfatycznymi, na znaczący udział tkanki limfoidalnej układu pokarmowego (GALT ang. gut associated lymphoid tissue) w kształtowaniu odporności ptaków oraz charakteryzuje największy wtórny narząd limfoidalny ptaków, śledzionę. Następnie, określa istotną funkcję odpowiednio ukształtowanej mikrobioty jelitowej w utrzymaniu homeostazy organizmu, wskazując na jej istotne działanie ochronne. Obrazuje również negatywne efekty zaburzeń składu mikrobioty jelitowej, w szczególności podkreślając ich wpływ na obniżenie

integralności bariery jelitowej. W kolejnym akapicie omówione zostały prebiotyki, wraz z przytoczeniem ich definicji na podstawie publikacji Robertfroida i wsp. (2010). Choć obrazuje ona efekty stosowania prebiotyków, to ogranicza ich zastosowanie jedynie do przewodu pokarmowego. W perspektywie zrealizowanych przez doktorantkę badań bardziej odpowiednia wydaje się obecna definicja prebiotyku jako substancji „selektywnie wykorzystywanej przez mikroorganizmy gospodarza i wywierającego w ten sposób efekty prozdrowotne” zaproponowana przez Gibsona i wsp. w 2017 roku. Nie ogranicza ona puli substancji prebiotycznych jedynie do niestrawnych węglowodanów, ponadto uwzględnia ich stosowanie również poza przewodem pokarmowym. Wstęp wieńczę, pozytywne efekty stosowania GOS jako dodatku paszowego dla ryb oraz w systemie stymulacji in-ovo u kurcząt. W tej części, w zdaniu „Obraz histologiczny ujawnił poprawę wysokości i grubości kosmków jelitowych, co sugeruje lepszą dojrzałość błony śluzowej jelita po suplementacji GOS” użyty został kolokwializm „lepsza dojrzałość”. Stosowniejszym wydaje się określenie - Obraz histologiczny ujawnił zmianę wysokości i szerokości kosmków jelitowych, co wpłynęło na stopień dojrzałości funkcjonalnej błony śluzowej jelita.

Kolejnym podrozdziałem jest „Wykaz artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej” w którym podano dane bibliograficzne i bibliometryczne rzeczonych publikacji, które zostały omówione w ocenie formalnej przedłożonej recenzji.

Kolejny rozdział stanowi „Uzasadnienie spójności tematycznej cyklu publikacji rozprawy doktorskiej” w którym doktorantka wskazuje problematykę badawczą obu prac jako analizę „immunomodulującego wpływu prebiotyku GOS (...) na dwa różne gatunki zwierząt gospodarskich z gromady ptaków i ssaków”. Wydaje się że, zamiast określać ryby mianem zwierząt gospodarskich można by obie grupy określić jako zwierzęta hodowlane. Początkowo, zaskakującym wydaje się połączenie w jednej rozprawie analiz dotyczących wpływu GOS u zwierząt reprezentujących dwie gromady. Między innymi ze względu na odmienny sposób podania prebiotyku. W mojej ocenie bardziej adekwatnym było by porównanie wpływu GOS na odpowiedź immunologiczną ocenianą na poziomie ekspresji genu w wybranych komponentach tkanki limfatycznej przewodu pokarmowego obu gatunków zwierząt, lub porównanie ekspresji wybranych paneli genów u obu gatunków w poszukiwaniu podobieństw efektów immunostymulacji pomiędzy GALT oraz SALT. Uznaję jednak argumentację Autorki, że „badania nad wpływem GOS na zmianę poziomu mRNA genów związanych z odpowiedzią immunologiczną u odległych ewolucyjnie gatunków zwierząt, jak kury i karpie, dostarczają szerokie(go) spektrum danych o interakcji między podanym

prebiotykiem a modulacją nieswoistej odpowiedzi immunologicznej.” Pomimo tego, że zrealizowane analizy dotyczą odmiennych komponentów układu odpornościowego. Powyższe pozwala uznać obie prace badawcze jako stanowiące cykl jednotematycznych badań. W mojej ocenie chybiony jest jednak argument wskazujący na spójność tematyczną publikacji poprzez zastosowanie wspólnej dla obu opracowań „metod(y) badawcz(ej) (RT-qPCR)”

Za prawidłowo sformułowane uznaję zarówno ogólną hipotezę badawczą zakładającą że: „*Prebiotyk GOS podany in ovo lub w paszy wpływa na modulację ekspresji genów związanych z układem immunologicznym u ptaka (kura) i ryby (karp)*” oraz idące w ślad za nią hipotezy szczegółowe: 1. „*GOS podany in ovo w 12. dobie inkubacji jaj wpływa na odpowiedź immunologiczną oraz odpowiedź na stres cieplny u kur wolno rosnących (Gallus gallus domesticus)*” oraz 2. „*GOS podany w formie dodatku paszowego wpływa na modulację względnej ekspresji genów związanych z nieswoistą odpowiedzią immunologiczną w śluzie skórny karpia zwyczajnego (Cyprinus carpio)*”. Wydaje się, że realizacja postawionego przez doktorantkę celu ogólnego oraz celów szczegółowych pozwala na weryfikację zakładanej hipotezy.

Rozdział „Materiał i metody badań” napisany jest w sposób przejrzysty, w odpowiednich miejscach autorka stosuje odsyłacze do odpowiednich publikacji. Dobór zwierząt, wielkość grup doświadczalnych oraz dobór metod badawczych oceniam pozytywnie i nie mam do niego zastrzeżeń. Badania przeprowadzono w oparciu o odpowiednie przepisy oraz zgody komisji ds. badań prowadzonych z użyciem modeli zwierzęcych. Podsumowując. Autorka wskazuje zastosowany w obu doświadczeniach prebiotyk GOS jako produkt Bi2tos®. Pierwsze doświadczenie przeprowadzono na wolno rosnących kurczętach mieszańcach linii Hubbard. W 12. dniu inkubacji jaj dokonano iniekcji *in-ovo* w przypadku grupy kontrolnej prebiotyku (3,5mg/jajo) oraz roztworu soli fizjologicznej w przypadku grupy kontrolnej. Po 36 dniach odchowu kurcząt, podzielono je na dwie podgrupy, jedną z nich utrzymując w warunkach komfortu cieplnego, zaś zwierzęta drugiej poddano stresowi cieplnemu: ostremu (8h) oraz chronicznemu (14 dni). Zwierzęta grup kontrolnych oraz badawczych poddano ubojowi w odpowiednich punktach czasowych zależnych od długości przebywania w warunkach stresowych. Podczas dyssekcji pobrano śledziony, z których wyizolowano mRNA. Pomiaru ekspresji panelu odpowiednio dobranych genów dokonano techniką RT-qPCR.

Drugie doświadczenie przeprowadzono na dwóch grupach rocznych karpia o masie ciała około 180g w układzie dwóch grup badawczych: kontrolnej oraz eksperymentalnej, żywionych odpowiednio dietą kontrolną oraz suplementowaną 2% dodatkiem prebiotyku GOS przez

50 dni. Po zakończeniu doświadczenia żywieniowego od zwierząt przyżyciowo pobrano śluz skórny, w którym po wyizolowaniu mRNA dokonano pomiaru ekspresji panelu genów, które weryfikowano jako stabilne geny referencyjne dla śluzu skórniego karpia, a także genów związanych z procesami odpornościowymi.

W rozdziałach „Wyniki” i „Dyskusja” odpowiednio opisano i podsumowano uzyskane wyniki badań. Tu należy zwrócić uwagę, że w celu ułatwienia ich śledzenia w tekście pracy powinny znaleźć się odpowiednie tabele i ryciny. W doświadczeniu dotyczącym kurcząt oszacowano wpływ czynników doświadczalnych z zastosowaniem dwuczynnikowej analizy wariancji. W której wskazano istotny wpływ GOS, ostrego stresu cieplnego oraz interakcji obu czynników na ekspresję genu *IL-4* w śledzienie kurcząt. Wykazano także, wpływ stymulacji GOS *in ovo*, na ekspresję wybranych genów indukowanych stresem (*BAG3*, *CAT* i *SOD*). Analiza efektu stymulacji *in-ovo*, chronicznego stresu cieplnego, oraz interakcji tych czynników wykazały, że stymulacja GOS istotnie wpływa na ekspresję genów dla *IL-2* oraz *IL-4*. Natomiast, stres cieplny istotnie reguluje ekspresję *IL-4* oraz *IL-12p40*. Interakcja obu czynników, wpłynęła na ekspresję genów kodujących enzymy antyoksydacyjne *CAT* i *SOD*. Należy jednak nadmienić, że zarówno w manuskrypcie pracy doktorskiej, jak i odpowiedniej publikacji nie przedstawiono trendów zmian ekspresji tych genów. Wiedza na temat kierunku zmian umożliwiła by szersze wnioskowanie o efekcie wpływu analizowanych czynników. Ponadto w punkcie 3.3.2. dotyczącym „efektów stymulacji *in-ovo* oraz formy stresu cieplnego na badane geny Doktorantka podaje odnośnik do rozdziału 4.2, który nie jest częścią analizowanej rozprawy doktorskiej.

W drugiej części doświadczenia analizowano relatywną ekspresję genów wynikającą z typu indukowanego stresu cieplnego oraz wpływu GOS na wzór ekspresji analizowanych genów podczas ekspozycji na odpowiedni czynnik stresogenny. Wykazano, że krótkotrwały stres cieplny nie wpływa na regulację ekspresji badanego panelu genów w śledzienie kurcząt. Wczesna stymulacja prebiotykiem GOS *in-ovo*, powodowała regulację w dół ekspresji genu dla *IL-4*. W pracy wykazano również istotny wpływ długotrwałego stresu cieplnego na wzrost poziomu ekspresji genów związanych z odpowiedzią układu immunologicznego (*IL-10* oraz *IL-12p40*), a także wskazujących na indukcję stresu oksydacyjnego (*CAT*, *SOD*) w śledzienie kurcząt. Efektem wczesnej stymulacji GOS *in-ovo*, był odmienny wzór ekspresji genów w śledzienie kurcząt w wyniku ekspozycji na ten typ stresu cieplnego. Stymulacja GOS spowodowała istotne obniżenie ekspresji genów dla obu indukowanych chronicznym stresem cieplnym cytokin (*IL-10* oraz *IL-12p40*), a także wpłynęła na obniżenie ekspresji genu dla *IL-4*.

W doświadczeniu przeprowadzonym na karpkach wykorzystując do tego celu oprogramowanie GeNorm wytypowano dwa stabilne geny referencyjne (*40s s11*; *ACTB*), które wykorzystano do normalizacji pomiarów ekspresji mRNA w śluzie skórnym. Wykazano, że suplementacja diety GOS stymuluje ekspresję genów kodujących INF γ oraz lizozym G, co wskazuje na stymulację przez ten prebiotyk zarówno mechanizmów oporności, jak i ukierunkowanej odpowiedzi immunologicznej. Analizując, publikację stanowiącą podstawę omawianych wyników uwagę zwraca obniżenie (choć nie potwierdzone statystycznie) ekspresji genu kodującego lizozym C, co stanowi odwrotny trend w porównaniu do zaobserwowanego wzrostu ekspresji genu *LyzG*. W związku z powyższym, proszę doktorantkę o próbę wyjaśnienia tego fenomenu. Ponadto, w doświadczeniu obserwowano obniżenie ekspresji genu kodującego białko C reaktywne, które należy do białek odpowiedzi ostrej fazy, co może wskazywać na przeciwzapalny wpływ zastosowanego prebiotyku.

Rozdział „Podsumowanie wyników i wnioski” wskazuje, że w przeprowadzonych badaniach potwierdzono zakładaną hipotezę, jednoznacznie wykazując że niezależnie od formy podania, jako wczesna suplementacja *in-ovo* w przypadku kurcząt, czy też wraz z dietą w przypadku karpka zwyczajnego, „GOS (...) wpłynął na modulację ekspresji genów związanych z układem immunologicznym”, a także odpowiedzią na stres. Doktorantka formułuje prawidłowe wnioski odzwierciedlające wyniki uzyskanych badań. Choć wniosek drugi w którym doktorantka opisuje wzrost ekspresji SOD oraz CAT jako czynników wskazujących na indukcję stanu zapalnego wywołanego stresem oksydacyjnym, wydaje się nieco na wyrost. We wniosku trzecim, Doktorantka wprost określa kierunek zmiany ekspresji genu dla IL-2, który nie został opisany w dysertacji. Uwagi te nie umniejszają jednak wysokiej wartości uzyskanych wyników badań.

Wysoko oceniam problematykę badawczą podjętą przez Doktorantkę. Wynika to z faktu że od momentu wyeliminowania ze stosowania od 2006 roku antybiotyków, jako dodatków paszowych i stymulatorów wzrostu wykorzystywanych w żywieniu zwierząt, wciąż poszukuje się kolejnych sposobów wpływania na mikrobiom organizmu poprzez stosowanie m.in. substancji o charakterze prebiotycznym. Określanie spektrum bezpośredniego i pośredniego oddziaływania prebiotyków na organizm zwierząt hodowlanych jest wciąż niezwykle aktualny, o czym świadczą pojawiające się w literaturze kolejne opracowania dotyczące tego zagadnienia. Oceniając pracę Pani mgr inż. Elżbiety Pietrzak przez ten pryzmat za najważniejsze osiągnięcia przedstawione w dysertacji należy uznać. 1) W doświadczeniu przeprowadzonym na kurczętach. Wykazanie możliwości ograniczenia strat produkcyjnych

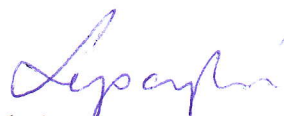
wywołanych stresem cieplnym poprzez zastosowanie wczesnej stymulacji prebiotykiem GOS *in-ovo*, poprzez łagodzenie skutków stresu cieplnego. Czego dowodzi modulacja ekspresji genów dla cytokin oraz poprzez prawdopodobna redukcja stresu oksydacyjnego, obrezowana obniżeniem ekspresji genów *CAT* oraz *SOD*. Można zakładać, że jest to prawdopodobny efekt odmiennego ukształtowania składu mikrobioty przewodu pokarmowego wynikający z wczesnej stymulacji prebiotykiem. Wiadomym jest, że mikrobiota przewodu pokarmowego kur kształtuje się dynamicznie w pierwszych dobach od wyklucia, a więc poprawa jej składu na tym etapie życia zwierząt może wywierać szereg pozytywnych efektów na stan zdrowia gospodarza w późniejszych etapach życia, tym samym istotnie wpływając na efekty produkcyjne. 2) W doświadczeniu przeprowadzonym na karpach zwyczajnych. Wykazanie, że suplementacja diety tych ryb prebiotykiem GOS wywołuje immunomodulujący efekt w błonie śluzowej skóry, manifestowany obniżeniem „poziomu ekspresji genu *CRP* należącego do białek ostrej fazy oraz aktywację ekspresji genów *IFN γ* i *LyzG*, wpływających na poprawę właściwości przeciwwirusowych i antybakteryjnych”. Ponadto 3) Wyniki obu doświadczeń wskazują na pozytywny immunomodulacyjny wpływ GOS, niezależnie od gromady zwierząt w przypadku której zastosowano jego suplementację.

Zakres, badań przeprowadzonych w ramach realizacji pracy doktorskiej oraz znaczący deklarowany udział w pracach naukowych będących podstawą analizowanej rozprawy świadczą o dużej samodzielności i dojrzałości naukowej Doktorantki. Należy podkreślić, że doktorantka opanowała technikę analizy ekspresji genów za pomocą reakcji RT-qPCR metodą $\Delta\Delta C_t$, a także analizę z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi bioinformatycznych umożliwiających wytypowanie genów referencyjnych. Należy także podkreślić fakt, że zrealizowane badania zostały wykonane w ramach dwóch projektów badawczych: międzynarodowego (OVOBIOTIC – „In ovo delivery of prebiotic in commercial and indigenous Italian chicken breeds provides a contribution to healthy food production under a heat stress”- finansowanego przez włoskie Ministerstwo Edukacji, Szkolnictwa Wyższego i Nauki) oraz krajowego (BN 51/2019 – „Badania z zakresu biotechnologii i genetyki zwierząt” – źródło finansowania pochodzące z subwencji na badania naukowe Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego).

Biorąc powyższe pod uwagę, stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr inż. Elżbiety Pietrzak pt.: „Wpływ galaktooligosacharydów na modulację ekspresji genów związanych z układem immunologicznym ptaków i ryb” wykonana pod kierunkiem dr hab. dr hab. inż. Anny Sławińskiej, prof. UTP spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r.

o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami w brzmieniu z dnia z dnia 15 września 2017 r. (Dz. U. 2017 r. poz. 1789.), zgodnie z Art. 175. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669).

W związku z powyższym przedkładam wniosek Szanownej Pani Przewodniczącej Rady Dyscypliny i Rybactwo, Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy o dopuszczenie mgr inż. Elżbiety Pietrzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. inż. Adam Lepczyński, prof. ZUT