Prof. dr hab. Andrzej K. Siwicki, profesor zwyczajny
Zakład Patologii i Immunologii Ryb
Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Troszok
pt. „Badania *in vitro* wpływu wybranych analogów nukleozydów na namnażanie się wirusa CyHV-3 w liniach komórkowych karpia (*Cyprinus carpio* L.)"
wykonanej w Zakładzie Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej PAN w Gołyszu
pod kierunkiem naukowym dr hab. inż. Andrzeja Pilarczyka, prof. PAN
oraz promotora pomocniczego dr Ilgiza Irnazarowa.

Na podstawie udostępnionych dokumentów, przekazanych przez prof. dr hab. Wandę Olech-Piasecką, Dyrektora Instytutu Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie (pismo nr WNZ.510.3.2018 INZ-20/2020 z dnia 18.02.2020 r.), przygotowano ocenę poprawionej rozprawy doktorskiej zgodnie z kryteriami określonymi w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr. 65, poz.595) z późniejszymi zmianami z dnia 15 września 2017 r. (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) oraz zgodnie z art. 175. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 poz.1669).

Otrzymana do recenzji poprawiona praca doktorska posiada klasyczny układ dla tego typu opracowań na stopień naukowy. Została przedstawiona na 112 stronach z uwzględnieniem 25 rysunków oraz 3 tabel. Podzielona jest na 8 rozdziałów obejmujących: wprowadzenie, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja wyników, podsumowanie i wnioski oraz piśmiennictwo i źródła internetowe. Streszczenie w języku polskim i angielskim zostało zamieszczone na początku dysertacji przed spisem treści. Do treści dysertacji wprowadzono bardzo ważny rozdział „Podsumowanie i Wnioski".

Cytowane piśmiennictwo w poprawionej wersji dysertacji zamyka się liczbą 115 pozycji literaturowych. Dobór bogatego, najnowszego piśmiennictwa wskazuje na dużą dojrzałość naukową doktorantki i umiejętność selekcji bogatej w tym zakresie literatury źródłowej. Opracowanie zawiera nowatorskie elementy, dotyczące wpływu wybranych analogów nukleozydów na replikację wirusa CyHV-3. Koncepcja badań jest bardzo interesująca, a uzyskane wyniki badań posiadają znaczący aspekt

poznawczy i praktyczny. Bogaty zbiór najnowszego piśmiennictwa prezentowany w dysertacji świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym doktorantki do realizacji założonych celów badawczych. Podjęty problem jest nowatorski, a uzyskane wyniki badań wnoszą nowe dane do terapii zakażeń wirusowych prowadzonej w warunkach *in vitro* oraz stwarzają nowe możliwości dotyczące ograniczenia strat powodowanych tym wirusem w hodowli karpia.

Przedstawiona do recenzji dysertacja napisana jest poprawnym językiem z prawidłowym użyciem nazewnictwa fachowego. Rozdział „Wprowadzenie" jest zwartą, logiczną i dobrze skomponowaną częścią dysertacji. Doktorantka w przekonywujący sposób uzasadnia potrzebę podjęcia ukierunkowanych badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Cel pracy napisany jest przekonywująco i bardzo przejrzyście. Autorka w sposób precyzyjny określiła najważniejsze cele zaplanowanych badań.

Rozdział „Materiał i metody" podzielony jest na 6 podrozdziałów w których autorka przedstawiła cenne elementy dotyczące:

- dwóch linii komórkowych (CCB i KF1) użytych do badań oraz ich pasażowanie w warunkach *in vitro*,
- pochodzenia, namnażania się i oznaczanie miana wirusa CyHV-3 użytego do badań doświadczalnych,
- analogów nukleozydów oraz ich cytotoksyczności,
- określenia przeciwwirusowej aktywności wybranych analogów nukleozydów.

Do badań w ramach dysertacji autorka użyła dwa analogi nukleozydów: acyklowir (ACV, Carbosynth, Wielka Brytania) substancja czynna stosowana w preparatach przeciwwirusowych zarejestrowanych i dopuszczonych do stosowania w medycynie ludzkiej oraz trójcykliczną pochodną acyklowiru o nazwie 3,9-dihydro-3-[(2-hydroksyetoksy)metylo]-6-(4-metoksyfenylo)-9-okso-5H-imidazo-[1,2-α]puryna (TACV) zsyntetyzowaną i udostępnioną przez dr hab. Tomasza Ostrowskiego z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Do badań oceniających wpływ różnych stężeń badanych preparatów doktorantka użyła najnowsze metody stosowane w ocenie skuteczności *in vitro* preparatów syntetycznych czy pochodzenia naturalnego w hamowaniu replikacji wirusów patogennych dla zwierząt i człowieka. W sposób jasny i zrozumiały opisuje zastosowane metody badawcze oraz uzasadnia konieczność ich użycia w ukierunkowanych badaniach w ramach

dysertacji. Cennym elementem tej części pracy jest precyzyjne przedstawienie zakresu badań eksperymentalnych obejmujących:

- ocenę wpływu analogów nukleozydów na zahamowanie efektu cytopatycznego powodowanego przez wirus CyHV-3,
- określenie ilość kopii wirusowego DNA,
- ocenę poziomu ekspresji genów wirusowych.

Doktorantka samodzielnie wykonała i prawidłowo użyła standardy plazmidowe do pomiaru ilości kopii wirusowego DNA oraz komórkowego DNA metodą Real Time qPCR typu TaqMan. W celu powielania fragmentu sekwencji DNA wirusa CyHV-3 oraz fragmentu sekwencji genu karpiowej glukokinazy doktorantka użyła prawidłowe startery, które zostały zsyntetyzowane dla potrzeb badań przez IBB PAN w Warszawie. Do porównania ekspresji genów wirusowych pomiędzy grupami eksperymentalnymi autorka zastosowała metodę RT qPCR, która pozwoliła na precyzyjną ocenę stopnia w jakim ekspresja genów wirusa CyHV-3 została zahamowana przez ACV i ACV-MP. Ta część pracy jest skomponowana prawidłowo i nie budzi zastrzeżeń merytorycznych.

Metody badawcze użyte w realizacji badań zaplanowanych w ramach dysertacji opisano bardzo zwięźle i przejrzyście. Zastosowane techniki badawcze zaliczane są do nowoczesnych metod powszechnie używanych w wirusologii porównawczej. Opis metod badawczych określających przeciwwirusową aktywność badanych analogów nukleozydów nie budzi zastrzeżeń, a przedstawiony tok postępowania metodycznego jest uzasadniony merytorycznie. Zastosowane techniki zaliczane są do najnowocześniejszych metod *in vitro* stosowanych do oceny skuteczności działania preparatów przeciwwirusowych.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań jest prawidłowa i pozwala prześledzić zachodzące zmiany, także w postaci dynamicznej, co w znaczący sposób ułatwia czytającemu dokonać obiektywnej oceny i interpretacji uzyskanych wyników badań prezentowanych w dysertacji. Rysunki są przygotowane starannie, a ich układ jest przejrzysty, co w znaczący sposób ułatwia prześledzenie kinetyki zmian w oznaczanych parametrach w poszczególnych etapach realizacji badań.

Rozdział „Dyskusja wyników" to próba analizy uzyskanych własnych wyników badań, na tle dostępnej literatury źródłowej. Konfrontacja wyników badań z wynikami uzyskanymi przez wiodące w tym zakresie ośrodki naukowe na świecie, została przedstawiona jasno i precyzyjnie. Ta bardzo istotna część dysertacji jest realną i

obiektywną oceną własnych badań na tle literatury światowej. Doktorantka w sposób logiczny i przekonywujący stara się przedstawić uzyskane wyniki badań nad wpływem wybranych analogów nukleozydów na tempo namnażania się wirusa CyHV-3. Uzasadnia w sposób przekonywujący możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników badań. Założone cele zrealizowała doktorantka w sposób optymalny, przy użyciu nowoczesnych metod badawczych. Przedstawione w dysertacji wyniki badań jednoznacznie wykazały, że ACV oraz T-ACV wykazują działanie hamujące na wzrost wirusa CyHV-3, podobnie jak w przypadku ludzkich herpeswirusów (HSV-1 i HSV-2). Jednakże stwierdzono, że T-ACV wykazuje słabszą aktywność niż ACV przeciwko wirusowi CyHV-3.

Uzupełnienie dysertacji o rozdział „Podsumowanie i wnioski" w znaczący sposób wzbogacił opracowanie i pozwolił na obiektywną ocenę uzyskanych wyników. Doktorantka w sposób bardzo przejrzysty przedstawiła uzyskane wyniki w formie krótkich 6 wniosków, które są sformułowane zwięźle i odzwierciedlają w pełni zakres badań oraz akcentują nowatorskie elementy dysertacji doktorskiej.

Cennym uzupełnieniem poprawionej dysertacji jest wpisanie na listę publikacji, w rozdziale „PIŚMIENNICTWO" dwóch własnych publikacji, w których doktorantka jest pierwszym autorem. Są to prace opublikowane w roku 2018 i 2019 w czasopismach anglojęzycznych z wysokim IF, które zawierają część wyników badań przedstawionych w dysertacji. Doktorantka przedstawiła i przesłała na adres Instytutu Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie oświadczenia współautorów tych prac z określeniem procentowym indywidualnego wkładu w ich powstanie. Cytowanie własnych publikacji umieściła doktorantka w tekście na 13 wybranych stronach. Jest to bardzo istotny element poprawionej dysertacji, pozwalający na prawidłową ocenę zakresu badań przedstawionych w pracy doktorskiej.

Po pełnej analizie pracy należy stwierdzić, że doktorantka przeanalizowała ponownie treść dysertacji i zmieniła szereg niezręcznych sformułowań, które w znaczący sposób poprawiły poziom merytoryczny pracy. Również doktorantka w sposób przemyślany przedstawiła na jednej stronie „podziękowania" osobom, które wspierały doktorantkę w trakcie realizacji dysertacji. Tak przedstawiona forma podziękowań jest bardziej czytelna i jest znacznie lepiej odbierana przez czytającego.

Na podstawie przedstawionej oceny stwierdzam, że mgr Agnieszka Troszok opanowała w pełni zasób wiedzy, pozwalających na realizację badań w zakresie

wymaganym od pracownika ze stopniem naukowym doktora, a oceniana praca doktorska posiada dużą wartość naukową i praktyczną.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agnieszki Troszok w pełni odpowiada warunkom stawianym tego typu opracowaniom na stopień naukowy doktora oraz spełnia warunki określane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr. 65, poz.595) z późniejszymi zmianami z dnia 15 września 2017 r (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) oraz zgodnie z art. 175. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r (Dz.U. 2018 poz.1669). W związku z pozytywną oceną dysertacji doktorskiej przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Agnieszki Troszok do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą ze względu na dużą wartość poznawczą i praktyczną badań.

Olsztyn, dnia 26.02. 2020 r.

Prof. dr hab. Andrzej K. Siwicki
profesor zwyczajny