Dr hab. Leszek Guz, prof. uczelni
Zakład Chorób Ryb i Biologii
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
20-950 Lublin, ul. Akademicka 13
E-mail: leszek.guz@up.lublin.pl

Lublin, 14 czerwca 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Ganny Sych
pt. „Wpływ diety zawierającej β-glukan na wybrane parametry systemu odpornościowego karpia (*Cyprinus carpio* L.)"

wykonanej w Zakładzie Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej,
Polskiej Akademii Nauk w Gołyszu
pod kierunkiem promotora dr hab. Andrzeja Pilarczyka, prof. PAN.
oraz dr Ilgiza Imazarow

Recenzję opracowano na zlecenie Instytutu Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie (pismo nr INZ-41/2021 z dnia 22.04.2021 r.). Recenzja ma na celu ustalenie, czy rozprawa doktorska Pani mgr Ganna Sych spełnia wymogi określone w art. 13 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 w brzmieniu z dnia 15 września 2017 r. (Dz.U. z 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).

β-glukany są polisacharydami – polimerami D-glukozy połączonych wiązaniami β-glikozydowymi (m.in. 1→3, 1→4, 1→6). Związki te naturalnie występują w tkankach roślin, grzybów i mikroorganizmów. Udokumentowano ich właściwości prozdrowotne oraz wspomaganie układu immunologicznego. Z tego powodu są dodawane do pasz dla zwierząt jako dodatek wspomagający układ odpornościowy. Ich podstawowy mechanizm działania związany jest z aktywacją makrofagów, limfocytów T i układu dopełniacza. Komórki układu odpornościowego rozpoznają β-glukany dzięki obecności receptorów tj. receptor układu dopełniacza 3 (CR-3 – bierze udział w fagocytozie cząsteczek/komórek wiążących składniki dopełniacza), receptor dektyna-1 (βGR - hamuje wytwarzanie IL-12 i stymuluje wytwarzanie IL-6 i IL-23 co promuje odpowiedź typu Th-17), receptory TLR-2/6 (poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB indukowana jest ekspresja mediatorów prozapalnych tj. TNFα, IL-12), laktozyloceramid (LacCer, CDw17), receptory „zmiatacze" (scavenger receptors). Liczne badania potwierdziły immunomodulujące działanie β-glukanu u ryb. Jednak dalsze badania dotyczące wpływu, skuteczności i mechanizmów działania są uzasadnione, zwłaszcza w chowie stawowym i stanie zagrożenia patogenami.

Przedstawiona do oceny poprawiona praca doktorska mgr Ganny Sych została napisana w języku polskim i ma typowy dla większości prac eksperymentalnych układ. Całość obejmuje 77 stron, na których zamieszczono: Oświadczenie promotora pracy, Oświadczenie autora pracy, Streszczenie, Summary, Spis treści, Wykaz skrótów, Wprowadzenie, Cel badań, Materiał i metody, Wyniki badań, Dyskusję wyników badań, Podsumowanie i wnioski oraz Piśmiennictwo. W pracy uwzględniono 174 pozycji literaturowych, 2 tabele i 15 rycin.

We wstępie Doktorantka przedstawiła charakterystykę gatunku karp (*Cyprinus carpio*), jego udomowienie, znaczenie dla akwakultury i posiadane zasoby genetyczne. Opisała układ odpornościowy ryb oraz środki i metody immunomodulacji. Ponadto, opisała immunomodulację ryb z wykorzystaniem β-glukanów. W tej części pracy Doktorantka nie zacytowała wieloautorskiej pracy z 2013 roku, której jest pierwszym i korespondencyjnym współautorem:

Ganna Sych., Patrick Frost., Ilgiz Irnazarow (2013) Influence of β-glucan (Macrogard®) on innate immunity of carp fry. Bull. Vet. Inst. Pulawy 57, 219-223.

Brak cytowania i informacji o własnej pracy jest szczególnie niezrozumiały ponieważ wyniki dotyczące wpływu β-glukanu na poziom białka całkowitego, aktywności lizozymu, α-2-makroglobuliny i dopełniacza aktywowanego drogą klasyczną u narybku karpia

(przedstawione w pracy doktorskiej w rozdziale 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 i 4.1.4) umieszczone w wyżej wymienionej publikacji, zostały przedstawione w prezentowanej pracy doktorskiej. Wyżej wymieniona publikacja została zacytowana w jednym miejscu dopiero w omówieniu wyników badań. Wstęp pracy powinien zawierać aktualny stan wiedzy na dany temat. Pomijanie własnej publikacji, która jest ciekawą i wartościową pozycją, jest niezrozumiałe. Bardzo proszę Doktorantkę o wytłumaczenie dlaczego nie cytuje własnej pracy w rozdziale Wprowadzenie, a w rozdziale Dyskusja zacytowała ją tylko raz, omawiając wpływ glukanu na aktywność układu dopełniacza w rozdziale 5.2. Omawiając aktywność lizozymu, A2M i układ dopełniacza w rozdziale 5.1 Doktorantka nie wspomina, że wyniki tej części pracy doktorskiej zostały już opublikowane wcześniej.

Wraz z poprawioną rozprawą doktorską, którą otrzymałem do recenzji, dołączone zostały oświadczenia współautorów pracy opublikowanej w 2013 roku. Wynika z nich, że Doktorantka ma w opublikowanej pracy większościowy udział wynoszący 70%.

Głównym celem badań analizowanej pracy doktorskiej jest określenie immunomodulującego wpływu β-glukanu na wybrane mechanizmy odpowiedzi immunologicznej karpi. Należy podkreślić, że rozprawa doktorska wpisuje się w szeroki kontekst badań prowadzonych w Zakładzie Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej w Gołyszu a przedstawione badania zostały dofinansowane ze środków projektu UE „Training network on protective immune modulation in warm water fish by feeding glucans" (NEMO).

W rozdziale **Materiał i metody** szczegółowo opisano materiały wykorzystane w badaniach oraz metodykę prac doświadczalnych. Doktorantka nie przedstawiła informacji o pozwoleniu Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Uchwała NR 751/2010 z dnia 27 maja 2010 r. II Lokalnej komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Krakowie, wyrażająca zgodę na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach (w zakresie wniosku pt.: „Modulacja mechanizmów obronnych ryb ciepłolubnych poprzez zastosowanie glukanów – sieć badawczo szkoleniowa") została dołączona do pracy oddzielnie. Uważam, że w poprawionej pracy informacja o pozwoleniu Komisji Etycznej powinna się znaleźć w rozdziale Materiał i metody.

Na stronie 23 Doktorantka napisała „utrwalono do dalszych analiz po 25 ryb z każdej grupy doświadczalnej". Wcześniej jednak napisała, że ryby były podzielone na 2 grupy (eksperymentalną i kontrolną) w 6 powtórzeniach każda (12 akwariów). Mam pytanie, z których akwariów pochodziły utrwalone do dalszych analiz ryby?

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób klarowny i syntetyczny. Brakuje jednak ryciny przedstawiającej wyniki badań zawartości globulin w homogenacie narybku karpia. Do wyników tych Doktorantka odnosi się w rozdziale Dyskusja pisząc, że „wzrost ilości białka był spowodowany głównie wzrostem frakcji globulinowej". Opis metody badania zawartości globuliny w homogenacie narybku karpia został opisany w rozdziale Materiał i metody. Wyniki badań zawartości globuliny nie są przedstawione w pracy doktorskiej a w opublikowanej pracy Sych i wsp. (2013). Wydaje mi się, że należało zacytować pracę własną w wyżej wspomnianym miejscu.

W przedstawionej pracy doktorskiej Doktorantka udowodniła, że trzytygodniowe żywienie ryb paszą zawierającą β-glukan skutkowało istotnym wzrostem całkowitej zawartości białka, poziomu lizozymu (w 5 i 6 w.p.h.), alfa-2-makroglobuliny (w 5 w.p.h) i aktywności dopełniacza aktywowanego drogą klasyczną (w 6 w.p.h.). W pracy przedstawiono dynamikę ekspresji genów składnika C3 dopełniacza, cząsteczki C1r/s i C4, C6, Bf, MBL (lektyna wiążąca mannozę), MASP (proteazy serynowej związanej z MBL) oraz wszystkich czterech izoform A2M we wczesnych etapach rozwoju ontogenetycznego karpia. Doktorantka wykazała istotne zwiększenie ekspresji genów *A2M-1* i *A2M-3*, *C1r/s* (w 6 w.p.h.), *C4* (w 4 w.p.h.) i *C6* (w 6 w.p.h.) oraz istotne zmniejszenie ekspresji genów proteazy serynowej związanej z lektyną wiążącą mannozę (*MBL*) (w 4, 5 i 6 w.p.h.).

Doktorantka wykazała, w teście challenge z użyciem bakterii *Aeromonas salmonicida,* wzrost aktywności układu dopełniacza aktywowanego drogą klasyczną oraz aktywności A2M (obserwowano od 0,25 d.p.i. do 2 d.p.i.).

Badała również poziom ekspresji genów *A2M* (*A2M-1*, *A2M-2*, *A2M-3* i *A2M-4*), genów dopełniacza *C3, C1r/s*, *C4, C6, Bf, MBL* i *MASP*, przy pomocy łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym. Wykazała, że dodatek β-glukanu zwiększył ekspresję genów *A2M-1, A2M-3, C1r/s, C4* i *C6*. Natomiast, ekspresja genu *MASP* uległa zmniejszeniu.

Podsumowując rozdział Wyniki, pomimo uwag recenzenta, Autorka wykazała umiejętność poprawnego i przekonywującego przedstawienia uzyskanych przez siebie wyników. Zrobiła to w sposób zwięzły i jasny dla czytelnika. Jest to najlepiej przygotowany rozdział rozprawy doktorskiej.

Uzyskane wyniki podsumowała i omówiła w rozdziale **Dyskusja**, odnosząc je do przedstawionych danych literaturowych.

W rozdziale Podsumowanie i Wnioski jest dużo powtórzeń wyników. Moim zdaniem wnioski powinny być napisane oddzielnie i nie powinny być streszczeniem, powtórzeniem i podsumowaniem wyników.

Bardzo lakonicznie przygotowane zostały rozdziały Streszczenie i Summary.

Z obowiązku recenzenta zwracam również uwagę na nieścisłości redakcyjne dostrzeżone w pracy.

Strona 9: pisząc o pierwszym pdgatunku trzeba napisać *Cyprinus carpio carpio*.
Strona 9: zdania „…karp wywodzi się z basenu Morza Czarnego, Aralskiego i Kaspijskiego, skąd gatunek ten rozprzestrzenił się na wschód docierając do Syberii i Chin, a także na wschód do dorzecza Dunaju (Balon, 1974). Obecnie karpie występują nie tylko w rzekach Europy i Azji, ale również zostały introdukowane do wód Australii i obu Ameryk" z rozdziału 1.1 zatytułowanego Charakterystyka gatunku, zostały powtórzone w prawie nie zmienionej formie, na tej samej stronie, w rozdziale 1.1.1 zatytułowanym Udomowienie karpia.
Strona 10: Doktorantka napisała, że „karpie osiągają wielkość od 30 cm do 1 m, rzadko do 1,5 m" a powinno być napisane, że „najczęściej karpie osiągają wielkość od 30 cm do 1 m, rzadko do 1,5 m".
Strona 11: jest napisane „narząd w układu odporności nabytej", „warstwa śluzu pokrywający skrzela"
Strona 12: jest napisane „Wykrycie czynników zakaźnych uruchomia wrodzoną odpowiedź".
Strona 12: wymieniając składniki odpowiedzi humoralnej, Doktorantka napisała na końcu „itd." – nie do końca wiadomo co miała na myśli?
Strona 13: jest napisane „Z lizozymem asocjowane są leukocyty", oraz „w przewodzie pokarmowym, śledzionie, śluzie, surowice, skrzelach".
Strona 13: publikacja napisana „Løvoll i wsp. 2007" – nie wiadomo czy chodzi o „Løvoll i wsp. 2007a" czy „Løvoll i wsp. 2007b" (zgodnie z tym co zostało napisane w rozdziale Piśmiennictwo).
Strona 14: jest napisane „naturalne zabójcy", „wywołując efekt wybuchu".
Strona 15: jest napisane „surowica IgM u ryb doskonałokostnych jest uważana za tetramer".
Strona 15: wymieniając główne składniki systemu immunologicznego, na końcu Doktorantka napisała „itd." – nie do końca wiadomo co miała na myśli.
Strona 16: jest napisane „środki chemiczne", „czynniki odżywcze odżywcze", „Spośród całej gammy…".

Strona 17: jest napisane „in vitro", „20011", B limfocyty".
Strona 19: jest napisane „… podawanie w składzie paszy β-glukanu podwyższa odporność …".
Strona 20: jest napisane „Kühlwein i wsp., (2013) wykazał …".
Strona 26: jest napisane „Kontrola negatywna to 3 x 10µl PBS + 125 µl *M. lysodeikticus*".
Strona 27: praca Ellisa w Techniques in Fish Immunology powinna być inaczej cytowana. Ellis, A. E. (1990). Serum Antiproteases in fish. In Techniques in Fish Immunology (ed. Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Robertson, B. S. and van Muiswinkel, W. B.), pp. 95–103. SOS Publications, Fair Haven.
Strona 30: w tabeli 2 Doktorantka napisała „Onara D.F. et al. 2008" oraz Zhiping W. et al. 2008", co jest niezgodne z wcześniej stosowanym zapisem.
Strona 32: jest napisane „obniżył się do poziomu 5,3 – 5,4µg/ml ($p<0,05$)".
Strona 51: jest napisane „w okresie pierwszych 2-6 tygodni życia".
Strona 53: jest napisane „podobnie jak przypadku wyżej omawianego lizozymu".
Strona 54: jest napisane „… podobne wyniki zostaną uzyskane w naturalnych środowisku, w warunkach produkcyjnych".
Strona 55: jest napisane „… peptydami proteolitycznymi i ich inaktywację".
Strona 56: jest napisane „ izoforma *A2M-2* wykazywał się …", „… aktywowany A2M indukuje …", „pozwoliły również zbadać dynamikę ekspresję siedmiu genów …".
Strona 63: publikacja „American Public Health Association. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater., Washington, D.C.: s. 1220'' jest ponownie cytowana na stronie 75 „Standard methods for examination of water and wastewater. 1998. American Public Health Association, 20th Edition, Washington DC".
Strona 69: publikacja „Lee L.K., Lerner B.W. 2003. World of Microbiology and Immunology. Gale Research Inc: 699" – nie została zacytowana w pracy doktorskiej.
Strona 72: publikacja „Pillermer L., Hutchinson M.C. 1945. The determination of the albumin and globulin contents of human serum by methanol precipitation. Journal of Biological Chemistry 158: 299-301" – nie została zacytowana w pracy doktorskiej.

Piśmiennictwo powinno być przygotowane według tego samego schematu.

Przedstawiona do oceny poprawiona praca doktorska mgr Ganny Sych, pomimo wyeksponowanych uwag krytycznych, stanowi opracowanie oryginalne, prezentujące wyniki badań na wysokim poziomie naukowym. Szczególnie wysoko oceniam badania ekspresji

genów dopełniacza i wszystkich czterech izoform A2M we wczesnych etapach rozwoju karpia żywionego paszą zawierającą β-glukan.

Podsumowanie

W mojej opinii Pani mgr Ganna Sych przedstawia bardzo ciekawe i wartościowe wyniki wnoszące wkład do nauki. Rozprawa doktorska, pomimo uwag krytycznych, jest wartościowym i oryginalnym dorobkiem Doktorantki. W mojej opinii Pani mgr Ganna Sych osiągnęła zamierzone cele, co wskazuje, że jest w pełni przygotowana do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Recenzowana praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w świetle przepisów 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 w brzmieniu z dnia 15 września 2017 r. (Dz.U. z 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).

Wnioskuję o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Ganny Sych do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 14 czerwca 2021 r. Dr hab. Leszek Guz, prof. ucz.