dr hab. inż. Magdalena Socha, prof. URK
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie
e-mail: magdalena.socha@urk.edu.pl

Kraków, 27.06.2022r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Ludmiły Kolek

pt. „Wpływ aktywności układu immunologicznego na sukces rozrodczy samców karpia (*Cyprinus carpio* L.)"

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Andrzeja Pilarczyka, prof. PAN oraz dr Ilgiza Irnazarowa z Polskiej Akademii Nauk, Zakład Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej w Gołyszu.

Rozprawa doktorska **Pani mgr Ludmiły Kolek** podejmuje bardzo ciekawą tematykę dotyczącą próby wyjaśnienia czy stymulacja układu immunologicznego oraz różnice osobnicze w działaniu wybranych mechanizmów odporności i produkcji 11-ketotestosteronu mają wpływ na jakość nasienia karpia i mogą zwiększyć lub obniżyć jego konkurencyjność, ocenianą jako zdolność plemników do zapłodnienia ikry.

Całość przedstawionego do oceny jednolitego opracowania obejmuje 123 strony i ma charakter odpowiedni dla tego typu prac. Składa się z: streszczenia (w języku polskim oraz angielskim), spisu treści, wykazu użytych skrótów, wprowadzenia, celu badań, opisu materiału i metod wykorzystanych do realizacji badań, omówienia wyników badań, dyskusji, podsumowania i wniosków oraz bibliografii (rozdział zatytułowany „literatura").

Rozdział **Wprowadzenie** liczący 20 stron, zawiera 5 podrozdziałów, które dotyczą następujących zagadnień:

- *Rozmnażanie ryb w akwakulturze i problem nierównego udziału samców w produkcji potomstwa*
- *Mechanizmy doboru płciowego*
- *Parametry jakościowe nasienia i czynniki, które na nie wpływają*
- *Związek między układem immunologicznym a układem rozrodczym*

- *Układ immunologiczny karpia*

W tej części pracy Doktorantka wykazała się aktualną wiedzą dotyczącą wyżej wymienionych zagadnień. W bardzo staranny i obszerny sposób Autorka wprowadziła w podjętą tematykę badawczą i uzasadniła zakres realizowanych, bardzo ciekawych prac.

Kolejna część pracy: **Cel badań** (ponad 2 strony), według mnie jest zbyt obszernie opisana. Właściwie 4 pierwsze akapity mogłyby znaleźć się w początkowej części pracy - Wprowadzenie. Natomiast opis 2 zastosowanych modeli stymulacji systemu odpornościowego samców karpia (poprzez zastosowanie zakażenia pasożytem *Trypanosoma borreli*, czy wywołanie ostrego zapalenia przez zastosowanie zymosanu) dotyczy raczej części metodycznej. Pomiędzy tymi informacjami znajduje się podstawowy cel przeprowadzonych badań oraz na końcu rozdziału wypunktowane są nurtujące Doktorantkę zagadnienia, na które szukała odpowiedzi dzięki dobrze zaplanowanym i wykonanym eksperymentom.

Część doświadczalna pracy, licząca 56 stron, obejmuje podrozdziały: ***Materiał i metody*** **oraz** ***Wyniki badań.*** Metodyka przedstawionych badań (21 stron) zawiera szczegółowy opis doświadczeń, jak również informacje o liczbie i pochodzeniu zwierząt (łącznie 44 dojrzałe płciowo samce karpia polskiej linii hodowlanej 3) wykorzystanych w procedurach, za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Katowicach (Uchwała nr 56/2018).

Podpunkty podrozdziału 3.2 o numeracji od 3.2.5 do 3.2.8 (dotyczące odpowiednio: analizy parametrów jakościowych nasienia, analizy proteomu plazmy nasienia, pomiaru poziomu 11-KT oraz analizy statystycznej) sprawiają wrażenie jakby odnosiły się jedynie do badanej procedury ostrej reakcji zapalnej (3.2 – Wpływ ostrej reakcji zapalnej wywołanej zymosanem na jakość nasienia i sukces reprodukcyjny samców karpia) a w większości dotyczą także procedury zakażenia pasożytem krwi *Trypanoplasma borreli*, zatem podrozdziału 3.1. Być może te podpunkty jako wspólne dla obydwu doświadczeń powinny być odpowiednio podrozdziałami (np. 3.3, 3.4, 3.5....itd.). Ponadto podpunkt dotyczący Zgody Komisji Etycznej posiada taki sam numer (3.2.7) jak pomiar poziomu 11-KT.

Według mnie dobór gatunku ryb do zaplanowanych badań, zastosowane przez Doktorantkę różnorodne metody [m.in. metoda CASA, ELISA (stężenie 11-KT, oraz pomiar poziomu specyficznych przeciwciał), analiza integralności DNA, reakcja PCR w czasie rzeczywistym (poziom ekspresji genów *TNF-α1*, *TNF-α2* i *IL-1β*), analiza proteomu plazmy

nasienia] jak i sposób przeprowadzenia badań są w pełni poprawne i nie budzą zastrzeżeń. Na podkreślenie zasługuje finalne doświadczenie, w którym mierzony był także sukces rozrodczy, czyli procent zapłodnionej ikry oraz % wyklutych larw.

Uzyskane przez Doktorantkę **Wyniki badań** zostały zeprezentowane łącznie na 23 rysunkach (z czego 22 to wykresy i rysunek nr 23 to trzy schematy obrazujące ścieżki kanoniczne) oraz w ośmiu tabelach. Przy czym tabele o nr 6 i 7 (str. 78) mają zduplikowaną numerację z tabelami ze stron 85 oraz 92. Na rysunku 13 nie zamieszczono wartości dla grupy kontrolnej, brakuje zaznaczenia istotnych statystycznie różnic oraz opisu jednostek poziomu 11-KT.

W rozprawie doktorskiej pani mgr Ludmiła Kolek przytoczyła ponad 180 prac naukowych dotyczących zagadnień metodycznych, omawianej problematyki prezentującej wyniki wcześniejszych prac związanych ze specyfiką rozrodu ryb, w tym rozmnażaniem ryb w akwakulturze, ze szczególnym uwzględnieniem samców i problemem nierównego udziału samców w produkcji potomstwa. W większości są to prace opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych, co pokazuje, że Doktorantka umiejętnie wykorzystuje dorobek swojej dyscypliny naukowej.

Uzyskane wyniki dowiodły, że istnieje związek między aktywnością systemu odpornościowego a jakością nasienia karpi. Podstawowe parametry ruchowe plemników (oprócz BCF) wykazywały obniżone wartości w odpowiedzi na stan zapalny. Badania wykazały, że reakcja zapalna powoduje obniżenie sekrecji 11-ketotestosteronu oraz zwiększa procent występowania uszkodzenia DNA plemników. Doktorantka wykazała także, iż proces zapalny istotnie zwiększył udział białek związanych z odpowiedzią immunologiczną w plazmie nasienia.

Jako recenzent mam jednak kilka pytań do Autorki:

- Czy znana jest średnia masa ciała samców karpia użytych w drugiej procedurze (ostrej reakcji zapalnej) oraz czy były stymulowane hormonalnie przed tarłem?
- Jaką objętość krwi pobierano od samców karpia do zaplanowanych analiz?
- Czy samice od których pobierano ikrę do kontrolowanego tarła były te same w obydwu doświadczeniach?

- Dlaczego zdecydowano się na oznaczenie jedynie 11-KT?
- Czy drugi pobór/oznaczenie poziomu 11-KT było po infekcji w dniu tarła (str. 62), czy też jeden dzień przed tarłem (str. 38 oraz 56)?

Z racji wykonywanej pracy recenzenta przedstawiam kilka sugestii dotyczących dysertacji, pozostałe zauważone drobne błędy literowe są zaznaczone w wersji papierowej pracy.

Sugestie:

- ujednolicenie jednostek w całej pracy
- cytacje w chronologicznej kolejności
- str. 22 jest: „Ponadto u niektórych karpiowatych, takich jak brzana *Barbus barbus* L. (Cejko i wsp., 2012) i karaś *Carassius carrassius* L. (Cejko i wsp., 2013), amplituda bocznego przemieszczenia główki (ALH) może również służyć jako wskaźnik jakości nasienia (Cejko i wsp., 2012, 2013)" a wystarczy podanie odpowiedniej cytacji tylko na końcu zdania: Ponadto u niektórych karpiowatych, takich jak brzana *Barbus barbus* L. ~~(Cejko i wsp., 2012)~~ i karaś *Carassius carrassius* L. ~~(Cejko i wsp., 2013),~~ amplituda bocznego przemieszczenia główki (ALH) może również służyć jako wskaźnik jakości nasienia (Cejko i wsp., 2012, 2013).
- str 110 - Tytuł rozdziału „Literatura" – bardziej adekwatna nazwa rozdziału to Piśmiennictwo lub Bibliografia

Podsumowując, moja ocena merytoryczna pracy jest wysoka, postawione cele pracy zostały zrealizowane, wyniki zostały logicznie omówione i stanowią znaczący wkład do poznania wpływu reakcji odpornościowej na ważne parametry jakościowe nasienia karpia (*Cyprinus carpio* L.), których zwieńczeniem jest sukces rozrodczy w postaci zapłodnienia. Całość została napisana starannie, poprawnym językiem polskim. Drobne uchybienia i błędy literowe zauważone w trakcie czytania pracy, w większości traktuję jako „omyłki pisarskie", które w żadnym stopniu nie pomniejszają wartości merytorycznej recenzowanej dysertacji mgr Ludmiły Kolek. Dodatkowo o wysokiej wartości prezentowanych danych świadczy opublikowana już, z części otrzymanych wyników, w 2021 praca w czasopiśmie Aquaculture (Kolek et al., 2021; 140 pkt MNiSW, *IF* – 4,24).

Wiosek końcowy:

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **mgr Ludmiły Kolek** pt. „Wpływ aktywności układu immunologicznego na sukces rozrodczy samców karpia (*Cyprinus carpio* L.)" spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65/03, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Ludmiły Kolek do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

dr hab. inż. Magdalena Socha, prof. URK