Prof. dr hab. Michał Reichert
Zakład Chorób Ryb
Państwowy Instytut Weterynaryjny - PIB
ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Puławy, 1 lipca 2022r

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Ludmiły Kolek pt. Wpływ aktywności układu immunologicznego na sukces rozrodczy samców karpia (*Cyprinus carpio* L.) wykonanej w Zakładzie Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej Polskiej Akademii Nauk w Gołyszu pod kierunkiem dr hab. inż. Andrzeja Pilarczyka, prof. PAN (promotora) oraz dr Ilgiza Irnazarowa (promotora pomocniczego).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Ludmiły Kolek została wykonana w Instytucie Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Andrzeja Pilarczyka, oraz dr Ilgiza Irnazarowa z Polskiej Akademii Nauk, Zakładu Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej w Gołyszu.

Tematyka pracy obejmuje zagadnienia związane z odpornością wrodzoną, a także wpływem procesów zapalnych na jakość nasienia karpia, a co za tym idzie zdolności do zapłodnienia.

Rozprawa doktorska ma typowy dla tego typu opracowań układ. Liczy w sumie 123 strony i jest w sposób przejrzysty podzielona na klasyczne rozdziały i dodatkowo liczne podrozdziały. Całość kończy, zawarty na 13 stronach, bogaty wybór piśmiennictwa związany ściśle z tematyką pracy. Należy podkreślić, że znaczna część cytowanych prac pochodzi z ostatnich 10 lat co świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu Autorki w problematyce dotyczącej omawianych zagadnień. Warto podkreślić właściwą proporcję poszczególnych rozdziałów dysertacji. Zwracają uwagę zwłaszcza rozdziały „Wprowadzenie oraz Dyskusja wraz z Wnioskami", które łącznie zajmują 36 stron. Podkreślam ten fakt, gdyż jest to ta część dysertacji, gdzie najbardziej uwidacznia się twórcza inwencja Autorki oraz znajomość aktualnego stanu wiedzy w zakresie problematyki poruszanej w dysertacji. Na podkreślenie zasługuje również zamieszczony w pracy na str. 11 - 12 wykaz użytych skrótów co zwłaszcza z uwagi na cytowanie prawie wyłącznie publikacji i opracowań angielskojęzycznych (tylko jedna praca w j. polskim) bardzo ułatwia analizę wyników. W tym kontekście, moim zdaniem należało być konsekwentnym i zamieścić również tłumaczenia angielskich skrótów dotyczących parametrów nasienia np.: MOT, VCL, VAP itp. Wyniki uzyskane w pracy zostały bogato zilustrowane na 23 rysunkach i w postaci 7 tabel. Wartym podkreślenia

jest fakt opublikowania części uzyskanych wyników dotyczących badań nad rolą zakażeń pasożytem *Trypanoplasma borreli* na jakość nasienia i reprodukcję karpia. Wyniki tych badań opublikowano w cenionym czasopiśmie „Aquaculture".

Pod względem językowym rozprawę należy ocenić bardzo wysoko. Autorka pisze poprawną polszczyzną, a także biegle używa fachowych określeń. Już lektura rozdziału „Wprowadzenie" rodzi przekonanie o biegłej znajomości tematu przez Autorkę, a sposób prezentacji aktualnego stanu wiedzy w temacie i uzasadnienie wybranego podejścia metodycznego dla osiągnięcia zakładanych celów nie budzi wątpliwości. Wartym podkreślenia jest wybór tematu pracy tj. badań nad wpływem aktywności układu immunologicznego ryb, w tym przypadku karpia, na sukces rozrodczy tego gatunku, gdyż na ten temat jest ograniczona liczba publikacji. Obecna praca przyczynia się w znaczącym stopniu do wypełnienia tej luki. Chciałbym również zwrócić uwagę na wyjątkowo staranne i oparte na dobrze dobranej literaturze naukowej omówienie zależności pomiędzy układem immunologicznym a układem rozrodczym. Autorka słusznie zauważa, że nie istnieją jednolite wzorce reagowania układu rozrodczego na infestacje pasożytnicze lecz to w jaki sposób organizm ryby reaguje zależy od danego gatunku i może się diametralnie różnić. Swoje wnioski opiera na starannie dobranej literaturze naukowej. Na uwagę zasługuje również omówienie roli stresu oksydacyjnego, a także układu hormonalnego, co jest warte podkreślenia z uwagi na sprzeczności pojawiające się w tym kontekście w badaniach wielu autorów. W kontekście głównego tematu pracy warto jednak pamiętać, że obrona organizmu gospodarza przed pasożytami, wirusami, bakteriami to co prawda bardzo ważna, ale nie jedyna funkcja układu odpornościowego ryb w utrzymaniu fizjologii organizmu ryby. Dotyczy to m.in. rozwoju szkieletu, mózgu, angiogenezy, regeneracji i naprawy tkanek, w tym szczególnie skóry, mięśni szkieletowych i serca, nerek, wątroby i mózgu. Tak więc odpowiednie ukształtowanie składowych układu immunologicznego ryby ma bezpośrednie przełożenie na poziom odporności wrodzonej czyli nieswoistej. Autorka potwierdza tę prawdę już w pierwszym wniosku podsumowującym dysertację, stwierdzając, że, cyt. „siła oddziaływania pasożyta *T. borreli* zależna jest od indywidualnej efektywności mechanizmów odporności wrodzonej lecz nie odporności swoistej".

Autorka jako cel główny pracy postanowiła podjąć próbę wyjaśnienia czy aktywacja układu immunologicznego i 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. Stronę metodyczną oceniam jako adekwatną do realizacji zaplanowanego celu i umożliwiającą uzyskanie odpowiedzi odnośnie roli układu immunologicznego samców karpia w rozrodzie tego gatunku. Na szczególne podkreślenie zasługuje dobór metodyki badań, w tym zwłaszcza badania proteomiczne (analiza LC-MS/MS), oraz analiza bioinformatyczna, które dostarczyły nowych danych

w aspekcie wpływu układu odpornościowego na wyniki rozrodu karpia. W tym miejscu nasuwa się drobna uwaga dotycząca opisu parametrów przy pozyskiwaniu wiciowców stosowanych następnie do zarażania ryb. Podawanie jedynie liczby obrotów rotora wirówki i nazwy firmy (Heraeus) utrudnia ewentualne odtworzenie procedury przy użyciu innego sprzętu, a to m.in. jest celem opisu metodyki w publikacji. Zasadą jest podawanie stosowanego przeciążenia „g" (rcf) ewentualnie dokładniejszej charakterystyki rotora.

Zwracam również uwagę na niejasne sformułowanie odnoszące się do procedury zakażania samców karpi pasożytem *Trypanoplasma borreli* (str. 39). Według opisu zakażenie wykonano podając dootrzewnowo 1 x 10^5 wiciowców/ml PBS czyli inaczej stosując koncentrację 100 000 wiciowców/ml PBS. Nie podano jednak ile mililitrów tej zawiesiny wstrzykiwano rybom. Dlatego należy opis doprecyzować.

Należy podkreślić dobry wybór Autorki, jeśli chodzi o aparaturę zastosowaną do analizy proteomu plazmy nasienia. Połączenie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (LC) z tandemową spektrometrią mas (MS/MS) pozwalana na identyfikację badanego związku w oparciu o widmo masowe, co zapewnia wyjątkową specyficzność i umożliwia ilościowe oznaczanie substancji nie do końca rozdzielonych chromatograficznie. Bardzo duża selektywność tej metody umożliwia oznaczanie wybranych substancji w złożonych mieszaninach bez konieczności ich całkowitego rozdziału, przez co możliwe jest szybsze przygotowanie próbek do analizy.

Dyskusja. W tej części pracy Autorka poddała ocenie i porównała uzyskane wyniki z danymi literaturowymi w sposób przekonujący z pewnym spojrzeniem krytycznym.

Zastanawiający jest brak obecności pasożytów aż u 65% zakażonych ryb. Zakładając, że stosowana metoda zakażania była w pełni powtarzalna jedynym wytłumaczeniem może być wyjątkowo wysoki poziom przeciwciał anty - *Trypanoplasma borreli* u ryb użytych w doświadczeniu. Autorka podaje że u 65% karpi pasożytów nie wykryto. Prawdopodobnie jednak u części ryb z tej puli pasożyty były obecne ale intensywność tej inwazji była na bardzo niskim poziomie uniemożliwiającym ich wykrycie zastosowaną metodą. Ta niedoskonałość mogłaby zostać pokonana, gdyby zastosowano do diagnostyki dodatkowo np. metodę PCR w czasie rzeczywistym. Poza tym wiadomo, że w przyrodzie u karpia pospolitego powszechnie występują zakażenia mieszane np. *Trypanoplasma borreli* i *Trypanoplasma carassii*. Nie byłoby w tym nic niezwykłego, gdyby nie fakt, że zakażenia tymi pasożytami mają różne konsekwencje. Jak podają Joerink M. i wsp. (M. Joerink i wsp. Dev Comp Immunol, 31, 2007) karpie, które były wcześniej zarażone T. carassii, wykazywały zwiększoną odporność na ponowne zakażenie T. borreli. Co więcej karpie zakażone jednocześnie T. borreli i T. carassii wykazywały znacznie niższy poziom parazytemii oraz tendencję do wyższej przeżywalności, a także wcześniejszą i wyższą produkcję przeciwciał niż karpie zakażone wyłącznie T. borreli. Reasumując, oparcie się przy określaniu stopnia parazytemii jedynie na liczeniu pasożytów w komorze Burkera jest oczywiście

poprawne, jednak zastosowanie dodatkowo metody RT-PCR umożliwiłoby bardziej dokładne określenie rzeczywistego statusu immunologicznego ryb doświadczalnych.

Pod względem językowym rozprawę należy ocenić bardzo wysoko. Autorka pisze poprawną polszczyzną, biegle posługuje się określeniami fachowymi, a każde nowe pojęcie wyjaśnia, dodając także dla uniknięcia niejasności jego angielskojęzyczny odpowiednik

Nie mam większych uwag odnośnie tego rozdziału. Uważam, że ostateczne konkluzje są uzasadnione. Autorka zauważyła, że wyniki przeprowadzonych badań nie umożliwiły wykazania negatywnego wpływu aktywacji układu immunologicznego samców karpia na sukces rozrodczy pomimo pogorszenia niektórych parametrów jakościowych nasienia. Jak następnie słusznie konkluduje ten negatywny wpływ był „maskowany", a raczej kompensowany nadmiarem plemników. Dlatego też zgadzam się z Autorką, że bardziej wartościowe wyniki byłyby możliwe do uzyskania gdyby doświadczenie przeprowadzono w warunkach tarła naturalnego.

Pomimo, generalnie bardzo pozytywnej oceny pracy Autorka nie ustrzegła się drobnych potknięć, które nie zmieniają tej opinii, ale z obowiązku recenzenta czuję się zobowiązany do zwrócenia na ten fakt uwagi.

Autorka niekiedy wykazuje nadmierne upodobanie w zakresie słowotwórstwa. W związku z tym sugeruję unikanie sformułowania „zapasożycenie" – str. 29, 37, 38, 60, 108, lub zapasożycienie – str 95. Zamiast tego proponuję np. (str.108 p.5) „W przypadku inwazji pasożytniczej jej większe nasilenie koreluje dodatnio z liczbą plemników z uszkodzonym DNA".

Sugeruję doprecyzowanie zdania „Wyniki opisane w tej pracy pokazują, że samce z niskim początkowym poziomem przeciwciał mają tendencję do rozwijania wyższej odpowiedzi adaptacyjnej" (str 95) zamiast lakonicznego „i odwrotnie". To jest jednak praca naukowa, gdzie precyzja powinna być oczywista.

Moim zdaniem nie powinno się w pracy tej rangi jak niniejsza dysertacja używać określeń o charakterze żargonu. Przykładem jest pojawianie się określenia np. „falkonów" str 43, 49...

Również podobny charakter ma używanie określenia „ikrzynek" zamiast „ikrzyc".

Z kolei na str 103 – pierwszy akapit, sugeruję zamiast „U samców Z (iniekowanych zymosanem) zamianę np. na „U samców, którym podano w iniekcji (lub zastrzyku) zymosan".

Następna uwaga ma charakter redakcyjny i dotyczy rysunków załączonych w pracy. W przypadku niektórych np. 18, 19, 20 21 należało je powiększyć nawet kosztem dodatkowych stron, gdyż w obecnym formacie są nieczytelne ! (lupa też nie do końca zdaje egzamin). Jeśli na stronie znajduje się pojedynczy rysunek np. 22 A, 22 B czy 22 C to zadanie wydaje się trudniejsze, chociaż przy odrobinie dobrej woli można było

przedstawione schematy nieco przeformatować to znaczy inaczej je rozmieścić przestrzennie wykorzystując dostępne miejsce z jednoczesnym powiększeniem.

Kolejna uwaga dotyczy sprawy używania przez Autorkę dysertacji określenia „kanoniczny". Uważam, że to określenie jest zarezerwowane dla konserwatywnych szlaków sygnałowych ogólnie przyjętych jako norma (uniwersalnych), co do których nie ma wątpliwości, że niezależnie od układu biologicznego czy też pozycji w łańcuchu ewolucyjnym wyglądają podobnie. W tym kontekście używanie tego określenia dla np. szlaku sygnalizacji CLEAR nie wydaje mi się właściwe.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Na podstawie oceny przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej uważam, że podjęte w niej zadania zostały zrealizowane. Rozprawa zawiera oryginalne osiągnięcia poznawcze. Autorka wykazała, że potrafi zaplanować i zrealizować w sposób modelowy zadanie badawcze, a także wykazać się umiejętnościami w zakresie prowadzonych analiz teoretycznych i doświadczalnych. Ponownie pragnę podkreślić bardzo pozytywne wrażenie jakie pozostawia lektura „Dyskusji". Nie pozostawia ona najmniejszej wątpliwości o bardzo dobrym rozeznaniu Autorki w bieżącym piśmiennictwie mającym związek z tematem pracy.

Podsumowując można stwierdzić, że rozprawa Pani mgr Ludmiły Kolek pt." Wpływ aktywności układu immunologicznego na sukces rozrodczy samców karpia (*Cyprinus carpio* L.) spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. Ustaw nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnioskuję zatem o dopuszczenie Pani mgr Ludmiły Kolek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, ze względu na nowoczesny warsztat badawczy, konstruktywnie i wyczerpująco przedstawione opracowanie własnych wyników badań na tle aktualnego piśmiennictwa, oraz wnikliwą dyskusję składam wniosek o wyróżnienie pracy.



.....

/Michał Reichert/