

Dr hab. inż. Anna Hrabia, prof. nadzw. UR  
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt  
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Kraków, 14.12.2017

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr Arkadiusza Płowca**

pod tytułem

**"Wpływ prebiotyków i symbiotyków podanych *in ovo* na zmianę ekspresji  
genomu kury"**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Marii Siwek-Gapińskiej, prof. nadzw. UTP, promotora i Pani dr hab. inż. Anny Sławińskiej, promotora pomocniczego dotyczy bardzo aktualnego, niezwykle ważnego problemu naukowego i aplikacyjnego jakim jest modulacja mikrobiomu kury i jego wpływ na ekspresję genów, co w konsekwencji oddziałuje na funkcjonowanie organizmu ptaka. Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego NCN: 2011/01/B/NZ9/00642. Rozprawa liczy 96 stron, w tym: Wstęp - 2 strony, Przegląd literatury - 8 stron, Materiały i metody - 16 stron, Wyniki - 32 strony, Dyskusja - 12 stron, Wnioski - 1 strona, Spis piśmiennictwa - 12 stron oraz Streszczenia w języku polskim i angielskim. Zabrakło mi spisu stosowanych skrótów, co znacznie ułatwiłoby lekturę tekstu.

W krótkim wstępie Autor wskazuje na korzystny wpływ bakterii probiotycznych na funkcjonowanie organizmu ptaków oraz na brak w literaturze pełnych danych dotyczących mechanizmów działania tych bakterii, co dało podstawę do sprecyzowania hipotezy badawczej zakładającej, że stymulacja

mikrobiomu kury prebiotykami i symbiotykami podanymi *in ovo* wpływa na poziom ekspresji genów. W celu weryfikacji tej hipotezy Autor bardzo trafnie formułuje cztery pytania, które stanowią kolejne zadania badawcze:

- (1) czy różne probiotyczne szczepy bakteryjne wykazują zróżnicowany potencjał do immunostymulacji komórek gospodarza?
- (2) czy prebiotyk i bakterie probiotyczne podane *in ovo* do komory powietrznej przenikają przez błonę podskorupową do wnętrza jaja?
- (3) jak zmienia się ekspresja genów związanych z układem immunologicznym w czasie życia brojlerów po podaniu *in ovo* prebiotyku i symbiotyku?
- (4) jakie zmiany w transkryptomie wywołuje podanie prebiotyków i symbiotyków *in ovo*?

W kolejnym rozdziale Autor dokonuje przeglądu literatury omawiając mikrobiom, interakcje gospodarz-mikrobiom, możliwości stymulacji mikrobiomu, sposoby podawania prebiotyków, probiotyków i symbiotyków oraz charakterystykę właściwości probiotycznych mikroorganizmów, czym jasno wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy i uzasadnia cel podjętych badań. Podział tekstu na podrozdziały uczynił go bardziej przejrzystym.

Ambitne założenia pracy zostały zrealizowane przez Autora z sukcesem. Układ i kolejność doświadczeń jest poprawny. Do realizacji badań zastosowano z powodzeniem dwa modele badawcze tj. *in vitro* i *in vivo*. W modelu pierwszym wykorzystano linię komórkową kurczących makrofagów do oceny aktywności biologicznej probiotyków, głównie ich właściwości immunostymulujących. Oznaczono poziom ekspresji 10. receptorów Toll-podobnych w linii komórkowej, analizowano transkryptom linii komórkowej po stymulacji probiotykami i dokonano walidacji wyników mikromacierzy dla 10. genów. W drugim modelu wykorzystano technologię *in ovo* do podania prebiotyków i symbiotyków do komory powietrznej jaja. Oceniono przenikanie prebiotyków i probiotyków przez błonę podskorupową jaja oraz wpływ prebiotyków i symbiotyków na transkryptom kury. Analizowano zmiany

w ekspresji panelu genów związanych z układem immunologicznym w 1., 14. i 35. dniu życia ptaków w dwóch tkankach (migdałki jelit ślepych i śledziona) i zmiany w transkryptomie dorosłych ptaków (35. dzień). Tu wybrano trzy tkanki: migdałki jelit ślepych, śledziona i jelito grube. W badaniach zastosowano nowoczesne i pracochłonne metody badawcze głównie z zakresu biologii molekularnej, w tym hodowle komórek do oceny właściwości immunostymulujących bakterii, całogenomową macierz ekspresyjną do oceny zmian w transkryptomie linii komórkowej i w tkankach kurcząt brojlerów czy ilościową reakcję łańcuchową polimerazy do określenia ekspresji genów. Na szczególne podkreślenie zasługuje umiejętność zastosowania wielu narzędzi bioinformatycznych do analizy uzyskanych wyników. Ważny jest też fakt, że wszystkie badania zostały wykonane w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy. Metodyka badań została precyzyjnie opisana w rozdziale Materiały i metody, choć nie uniknięto drobnych błędów edytorskich takich jak brak odniesienia w tekście do tabeli 2., czy pomyłki w kolejności wskazywanych tabel.

Równie przejrzyste i czytelnie jak metody badawcze przedstawiono wyniki badań. Wyniki są dobrze udokumentowane i przedstawione na 14. rysunkach i w 6. tabelach. Drobne uchybienia jakie zauważyłam to w opisie rysunku nr 10 i 11 brak informacji czy podane są wartości odchylenia standardowego (SD) czy błąd standardowy średniej (SEM). Na rysunku 13 brak opisu osi Y. Błędy te mogą być łatwo skorygowane podczas przygotowania pracy do druku. Wyniki są bardzo interesujące, pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy molekularne działania prebiotyków, probiotyków i symbiotyków w organizmie ptaków, a szczególnie ich oddziaływanie na układ immunologiczny kurcząt. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale także mają znaczenie praktyczne dla przemysłu drobiarskiego.

Dyskusja jest napisana dobrze, tekst jest logiczny, a podział na tematyczne podrozdziały czyni go przejrzystym. Wyniki badań zostały przedyskutowane z danymi zawartymi w aktualnym światowym piśmiennictwie w sposób wyczerpujący. Szkoda, że po omówieniu wyników własnych, Autor nie postawił pytań, stanowiących swoisty drogowskaz dla przyszłych badań w omawianym temacie, których celem byłoby wyjaśnienie wielu dotychczas niezbadanych mechanizmów. Zachęcam Autora do przedstawienia dalszych perspektyw badawczych (propozycji przyszłych badań) podczas obrony rozprawy doktorskiej.

Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto 7 wniosków, które w mojej ocenie są stwierdzeniami, w syntetyczny sposób przedstawiającymi dokonania pracy. Autor powinien sformułować przynajmniej jeden wniosek natury ogólnej, który wskazywałby na znaczenie uzyskanych wyników badań.

Spis piśmiennictwa obejmuje 117 pozycji anglojęzycznych, z których ponad sześćdziesiąt procent zostało opublikowanych w ostatnich dziesięciu latach. Cytowane prace wybrano właściwie, jednak sposób cytowania w tekście rozprawy bardzo często jest niezgodny z obowiązującymi standardami. Spis piśmiennictwa również obfituje w liczne błędy edytorskie.

Podsumowując, przedstawioną do oceny rozprawę oceniam bardzo wysoko. Jest ona obszernym opracowaniem zawierającym oryginalne wyniki, które z pewnością mogą zostać opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie naukowym z wysokim IF. Uwagi jakie zgłosiłam z obowiązku recenzenta nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Mgr Arkadiusz Płowiec wykazał duże predyspozycje i umiejętność wykorzystywania różnorodnych technik badawczych, szczególnie analiz molekularnych, znajomość przedmiotowego piśmiennictwa, umiejętność planowania i wykonywania doświadczeń, zbierania, opracowania, prezentacji i interpretacji wyników, co predysponuje Go do dalszej pracy naukowej.

Z pełnym przekonaniem uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 „Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt UTP w Bydgoszczy wniosek o dopuszczenie mgr Arkadiusza Płowca do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 14.12.2017

