

dr hab. Marcin Lis

Kraków, dnia 29 marca 2019 roku

Zakład Weterynarii Rozrodu i Dobrostanu Zwierząt

Instytut Nauk Weterynaryjnych

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja

w Krakowie

### **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Aleksandry Dunisławskiej**

**pt.: „Modyfikacja transkryptomu kurcząt brojlerów**

**z wykorzystaniem technologii *in ovo*”**

wykonanej pod kierunkiem

**prof. dr hab. Marii Siewek-Gapińskiej**

i promotora pomocniczego

**dr hab. inż. Anny Sławińskiej**

Współczesna produkcja drobiarska ma charakter masowy, dlatego nawet niewielka poprawa stanu zdrowia i jakości piskląt przekłada się na wymierny efekt ekonomiczny. Jak do tej pory, za najskuteczniejszą metodę niedopuszczenia do rozwoju i/lub leczenia chorób bakteryjnych w stadach drobiu uważa się antybiotykoterapię. Z drugiej strony nasilające się zjawisko nabywania antybiooporności przez patogeny uzmysławia pilną konieczność opracowania skutecznej alternatywy dla stosowania antybiotyków weterynaryjnych. Wiele wskazuje na to, że jednym z rozwiązań może być immunostymulacja odporności nieswoistej organizmu kurczęcia przez podanie odpowiednio dobranego kompleksu prebiotyk—probiotyk (synbiotyku). Ponieważ najwyższe miano przeciwciał matczynych oraz zasiedlanie przewodu pokarmowego kurczęcia przez fizjologiczną

mikroflorę obserwuje się bezpośrednio po wykluciu, dlatego, aby w pełni wykorzystać właściwości takiego preparatu, jego podanie powinno nastąpić jak najwcześniej. Pozwala na to zastosowanie metody aplikacji *in ovo*. W praktyce hodowlano-weterynaryjnej, technika iniekcji *in ovo* z powodzeniem zastosowana została do immunizacji kur i indyków m.in. przeciw chorobie Gumboro, czy chorobie Mareka, a także dożywania zarodków kurzych (tzw. *in ovo feeding*) w celu poprawy ich powylęgowej kondycji.

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Aleksandry Dunisławskiej opiera się na innowacyjnym pomycie połączenia obu wymienionych zastosowań iniekcji *in ovo*. Doktorantka wychodzi z założenia, że skoro inokulacja kurczęcia fizjologiczną mikroflorą jelitową zachodzi w fazie perinatalnej i stanowi kluczowy czynnik w rozwoju i regulacji odpowiedzi immunologicznej, a także jest niezbędna dla prawidłowego trawienia, wchłaniania i metabolizowania składników odżywczych, to iniekcja synbiotyku/prebiotyku do komory powietrznej jaja w dwunastej dobie rozwoju embrionalnego powinna skutecznie poprawić skład i funkcjonowanie mikroflory jelitowej gospodarza, a w konsekwencji wywołać zmiany w ekspresji niektórych genów w okresie postembrionalnym.

W celu jej weryfikacji powyższej hipotezy zaplanowany został cykl bardzo dobrze przemyślanych doświadczeń, mających kolejno na celu: (1) selekcję substancji bioaktywnych (prebiotyku i probiotyku) *in vitro* dla otrzymania optymalnej ich kombinacji; (2) ocenę efektywności wytypowanych synbiotyków podanych *in ovo* na podstawie charakterystyki molekularnej przeprowadzonej w tkankach immunologicznych, jelitowych i metabolicznych; (3) analizę wpływu stymulacji *in ovo* na interakcję między mikroflorą jelitową a organizmem gospodarza. Wyniki badań przedstawione zostały w cyklu trzech, tematycznie spójnych prac:

- Dunisławska A., Sławinska A., Stadnicka K., Bednarczyk M., Gulewicz P., Jozefiak D., Siwek M. Synbiotics for Broiler Chickens—*in vitro* Design and Evaluation of the Influence on Host and Microbiota following *in ovo* Delivery. *PLoS ONE* 2017, 12(1): e0168587. DOI:10.1371/journal.pone.0168587.

- Dunisławska A., Sławinska A., Bednarczyk M., Siwek M. Transcriptome modulation by *in ovo* delivered *Lactobacillus* synbiotics in a range of chicken tissues. *GENE* 2019, 698, 27-33. DOI: 10.1016/j.gene.2019.02.068.
- Sławinska A., Dunisławska A., Płowiec A., Radomska M., Lachmanska J., Siwek M., Tavaniello S., Maiorano G. Modulation of microbial communities and mucosal gene expression in chicken intestines after galactooligosaccharides delivery *in ovo*. *PLoS ONE* 2019, 14(2): e0212318. DOI: 10.1371/journal.pone.0212318.

Wszystkie prace zostały opublikowane w uznanych czasopismach naukowych, objętych oceną przez ISI Journal Citation Reports, prezentujących prace z zakresu genetyki, biotechnologii i bioinżynierii. Łączna wartość wskaźnika wpływu (IF) dla wymienionych prac wynosi 8,04, a liczba punktów MNiSW - 90. W każdej z nich pani mgr inż. Aleksandra Dunisławska jest pierwszym lub drugim autorem, a jej wkład w ich powstanie jest niepodważalny i wiodący. Przedstawione oświadczenia współautorów publikacji jednoznacznie świadczą, że Doktorantka brała czynny udział we wszystkich etapach ich powstawania: od opracowania planu doświadczeń i założeń metodycznych, poprzez badania *in vitro* i podanie synbiotyków *in ovo*, pobranie materiału i wykonanie analiz molekularnych, statystyczne oraz bioinformatyczne opracowanie wyników, a na koniec przygotowania manuskryptów. Zakres wykonanej pracy, że świadczy o samodzielności i dojrzałości naukowej Doktorantki. Na szczególne wyróżnienie zasługuje opanowanie licznych metod laboratoryjnych m.in.: fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH); analizy transkryptomu kurcząt przy wykorzystaniu mikromacierzy; analizy ekspresji genów za pomocą reakcji RT-qPCR metodą ddCt. Należy także podkreślić fakt, że badania zostały wykonane w ramach dwóch międzynarodowych projektów badawczych: 1) ECO FCE – „*Monogastrics Feed Efficiency; ECO FCE. A whole-systems approach to optimise feed efficiency and reduce the ecological footprint of monogastrics*” –finansowanego przez Unię Europejską w ramach 7 Programu Ramowego; i 2) OVOBIOTIC – „*In ovo delivery of prebiotic in commercial and indigenous Italian chicken breeds provides a contribution to healthy food production under a heat stress*”- finansowanego przez

Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca z siedzibą w Rzymie (Włochy). Niewątpliwie doświadczenie zdobyte przez panią mgr inż. Aleksandry Dunisławskiej podczas wspólnej pracy i jednocześnie możliwości przedyskutowania wyników ze uznanymi specjalistami z kilku jednostek naukowych, w tym Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno – Przyrodniczego w Bydgoszczy, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Uniwersytetu Molise w Campobasso (Włochy) oraz z Poznańskiego Parku Naukowo – Technologicznego przełożyła się na bardzo wysoką jakość naukową ocenianej dysertacji.

W dołączonym do artykułów naukowych autoreferacie Doktorantka zestawiała i podsumowała wyniki wszystkich przeprowadzonych doświadczeń. W mojej ocenie, rozprawa dostarcza przekonujących argumentów, że: 1) podanie *in ovo* kompleksu probiotyk- prebiotyk stymuluje mikrobioty przewodu pokarmowego, a zakres i potencjał symbiotyku można zmieniać przez dobór odpowiednich komponentów. Badania pani mgr inż. Aleksandra Dunisławskiej udowadniają, że w przypadku synbiotyku składającego się z bakterii *Lactobacillus salivarius* i galaktooligosaccharydu, użyty prebiotyk stymuluje wzrost bakterii probiotycznych, a tym samym moduluje skład mikroflory jelitowej. Wpływa to na ekspresję i aktywację genów zaangażowanych w procesy immunologiczne, stymuluje funkcje bariery jelitowej oraz procesy metaboliczne w błonie śluzowej kurcząt. Natomiast synbiotyki składający się z *Lactobacillus. plantarum* i oligosacharydu z rodziny rafinozy wydaje się wykazywać synergistyczne, niezależne działanie obu komponentów, wpływając na szlaki metaboliczne w wątrobie kurcząt.

Analizując bezsprzeczny efekt symbiotyku na ekspresję genów odpowiedzialnych za procesy odpornościowe i metaboliczne kurczą nasuwa mi się jednak pytanie, w jaki sposób prebiotyk, przenikając przez błonę podskorupową do naczyń krwionośnych omocniokosmówki, jest równocześnie wykorzystywany przez probiotyk jako substrat do fermentacji w okresie pozostałych 7-8 dni inkubacji. Dlatego z obowiązku recenzenta, ale przede wszystkim z własnej naukowej ciekawości, chciałbym prosić o szersze niż to przedstawiono w „Autoreferacie”,

wyjaśnienie mechanizmu działania symbiotyków w przyjętej metodzie aplikacji *in ovo* do na błonę podskorupową, a także uzasadnienie wyboru terminu iniekcji.

**Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr inż. Aleksandry Dunisławskiej pt.: „Modyfikacja transkryptonu kurcząt brojlerów z wykorzystaniem technologii *in ovo*” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Siwek-Gapińskiej i promotora pomocniczego dr hab. inż. Anny Sławińskiej spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami w brzmieniu z dnia z dnia 15 września 2017 r. (Dz. U. 2017 r. poz. 1789.), zgodnie z Art. 175. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce1 (Dz.U. 2018 poz. 1669).**

W związku z powyższym przedkładam wniosek Szanownemu Panu Dziekanowi i Wysokiej Radzie Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Dunisławskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, pragnę podkreślić, że bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną i aplikacyjną recenzowanej pracy doktorskiej. Doceniam wybór interesującego, interdyscyplinarnego tematu, właściwy dobór i opanowanie metod oraz procedur badawczych, a przede wszystkim umiejętność wielokierunkowej interpretacji uzyskanych wyników. W związku powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z wnioskiem wyróżnienia dysertacji przygotowanej przez mgr inż. Aleksandrą Dunisławską.

Kraków, dnia 29 marca 2019

  
dr hab. inż. Marcin Lis