

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, 30 stycznia 2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Agnieszki Troszok

pt. „Badania *in vitro* wpływu wybranych analogów nukleozydów na namnażanie się wirusa CyHV-3 w liniach komórkowych karpia (*Cyprinus carpio* L.)”

wykonanej w Zakładzie Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej,

Polskiej Akademii Nauk w Gołyszach

pod kierunkiem promotora dr hab. Andrzeja Pilarczyka, prof. PAN.

oraz dr Ilgiza Imazarow

Recenzję opracowano na zlecenie Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo SGGW w Warszawie (pismo nr WNZ.510.3.2018, INZ-32/2019 z dnia 02.12.2019 r.). Recenzja ma na celu ustalenie, czy rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Troszok 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).

Acyklowir, jako lek przeciwwirusowy znany jest od 1977 roku (wprowadzony na rynek farmaceutyczny). Jest on analogiem nukleozydu guanozyny i działa jako specyficzny inhibitor wirusowej polimerazy. Ulega on aktywacji w komórkach zakażonych wirusem, co sprawia, że jest on mało toksyczny i bezpieczny w stosowaniu. Chociaż jego wchłanianie z przewodu pokarmowego człowieka jest niewielkie i wynosi od 15 do 30%, to jego dużą zaletą jest dobra zdolność do penetracji tkanek. Biorąc pod uwagę straty ekonomiczne związane z występowaniem wirusowych chorób ryb, wskazana jest intensyfikacja prac nad opracowaniem skutecznych metod leczenia.

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Agnieszki Troszok została napisana w języku polskim i ma typowy dla większości prac eksperymentalnych układ. Całość obejmuje 110 stron, na których zamieszczono: Oświadczenie promotora pracy, Oświadczenie autora pracy, Streszczenie, Summary, Wprowadzenie, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję wyników, Piśmiennictwo oraz Źródła internetowe. W pracy uwzględniono 113 pozycji literaturowych, 3 tabele i 25 rycin.

We wstępie Doktorantka wyczerpująco opisała chorobę karpia wywołaną przez wirusa CyHV-3 (Cyprinid herpesvirus 3) zwanego również KHV (koi herpesvirus) lub CNGV (carp international nephritis and gill necrosis virus). Szczególną uwagę zwróciła na duże straty ekonomiczne, jakie ponoszą hodowcy, związane z dużą śmiertelnością karpia wywołaną wirusem KHV. Ponadto wyczerpująco przedstawiła objawy choroby, zdolność wirusa do utrzymywania się w środowisku naturalnym, cykl replikacyjny wirusa, dotychczas stosowane metody zwalczania choroby wywołanej przez KHV oraz mechanizm działania acyklowiru. Treść i sposób opracowania tej części pracy doktorskiej, świadczą o bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę zagadnień odnoszących się do obszaru rozprawy. Pozwoliło to na sformułowanie głównego celu badań, jakim była ocena czy badane *in vitro* związki: 1) acyklowir (ACV), 2) fosforan acyklowiru (ACV-MP) oraz 3) trójcykliczna pochodna acyklowiru (T-ACV) mogą być pomocne w walce z wirusem KHV w chowie karpia. Badania miały na celu wyznaczenie bezpiecznej dawki badanych związków w kulturach komórkowych CCB (common carp brain) i KF1 (koi carp fin 1) oraz ocenienie wpływu bezpiecznych dawek na tempo namnażania się wirusa KHV w kulturach komórkowych.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób klarowny i syntetyczny. Na podkreślenie zasługują bardzo starannie opracowane i wyczerpująco opisane ryciny i tabel.

Doktorantka, analizując uzyskane wyniki udowodniła, że żaden z przeprowadzonych testów (MTT i MTS) nie wykazał istotnej toksyczności badanych związków w stężeniu mniejszym niż 66,67 μM . Badając wpływ ACV i ACV-MP w tym stężeniu na namnażanie się wirusa w liniach komórkowych 1) badano efekt cytopatyczny, 2) oznaczano ilość kopii DNA wirusa w komórkach, 3) określano względny poziom ekspresji genów wirusowych w komórkach. Doktorantka udowodniła, że badane związki hamują namnażanie wirusa KHV w badanych komórkach. Wykazała też, że ACV-MP skuteczniej hamował namnażanie wirusa niż ACV, a otrzymane wyniki wskazują, że ACV-MP najprawdopodobniej przedostaje się do wnętrza komórek i nie ulega natychmiastowej degradacji, co dotychczas było kwestionowane.

Przebadany w osobnej serii eksperymentów T-ACV wykazywał słabe działanie przeciwko wirusowi KHV. Podsumowując rozdział Wyniki, Autorka wykazała umiejętność poprawnego i przekonującego przedstawienia uzyskanych przez siebie wyników. Zrobiła to w sposób zwięzły, jasny dla czytelnika oraz bardzo poprawny redakcyjnie.

Uzyskane wyniki podsumowała i omówiła rzeczowo w rozdziale **Dyskusja**, odnosząc je do przedstawionych danych literaturowych. Na podkreślenie zasługuje bardzo dogłębna analiza uzyskanych wyników. Natomiast, bardzo lakonicznie przygotowane zostały rozdziały Streszczenie i Summary, oraz nie zamieszczono wniosków.

Znaczna część wyników przedstawionych w ocenianej pracy doktorskiej została opublikowana w 2018 r. i 2019 r. w pracach:

- 1) Agnieszka Troszok, Ludmiła Kołek, Joanna Szczygieł, Joanna Wawrzeczko, Ewa Borzym, Michał Reichert, Teresa Kamińska, Tomasz Ostrowski, Patrycja Jurecka, Mikołaj Adamek, Krzysztof Rakus, Ilgiz Imazarow (2018) „Acyclovir inhibits Cyprinid herpesvirus 3 multiplication *in vitro*”. *Journal of Fish Diseases* 41(11), 1709-1718. <https://doi.org/10.1111/jfd.12880>.
- 2) Agnieszka Troszok, Ludmiła Kołek, Joanna Szczygieł, Tomasz Ostrowski, Mikołaj Adamek, Ilgiz Imazarow (2019) Anti-CyHV-3 effect of fluorescent, tricyclic derivative of acyclovir 6-(4-MeOPh)-TACV *in vitro*. *Journal of Veterinary Research* 63, 513-518.

Prace przeszły zatem proces recenzji i spełniły bardzo wysokie wymagania stawiane w czasopiśmie, zarówno co do poziomu merytorycznego jaki i edytorskiego. Poziom opublikowanych prac jest oczywiście bez zarzutu. Pani mgr Agnieszka Troszok jest pierwszym współautorem w wyżej wymienionych pracach, natomiast autorem korespondencyjnym jest dr

Ilgiz Imazarow - w pierwszej pracy, i mgr Agnieszka Troszok – w drugiej pracy. Pierwsza praca liczy 12 współautorów, a druga 6. W ocenianej pracy doktorskiej mgr Agnieszki Troszok nie znalazłem żadnej informacji odnoszącej się do opublikowanych w pracach Troszok i wsp. (2018, 2019) wyników. **Doktorantka nie zacytowała własnych/wieloautorskich publikacji, w których występują wyniki prezentowane w pracy doktorskiej. Nie zamieściła też stosownych oświadczeń współautorów, wskazujących zakres indywidualnego wkładu doktorantki.**

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

- Brakuje alfabetycznego wykazu skrótów.
- Na stronie 43, 44 i 74: napisano „test MTS”. Z tekstu wynika, że chodzi o test z fioletem krystalicznym (CV).
- Na stronie 47 użyto skrótu FCS bez podania wytłumaczenia co oznacza.
- W pracach pisanych po polsku nie należy używać skrótów angielskich, takich jak: „h” lecz „godz.”.
- Brakuje wniosków końcowych wynikających z przeprowadzonych badań.

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Agnieszki Troszok, pomimo wyeksponowanych uwag krytycznych, stanowi opracowanie oryginalne, prezentujące wyniki badań na wysokim poziomie naukowym, dobrze zaplanowanego doświadczenia.

Doktorantka jest współautorką 4 publikacji w wysoko punktowanych czasopismach (w 2 pracach jest pierwszym autorem). Liczba cytowań publikacji wynosi 16 a indeks Hirscha wg bazy Web of Science wynosi 2.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Troszok wymyka się jednoznacznej ocenie. Jest to praca wartościowa i oryginalna. W mojej opinii Pani mgr Agnieszka Troszok przedstawia bardzo ciekawe i wartościowe wyniki wnoszące wkład do nauki. Dostrzegam jednak szereg niedociągnięć formalnych, obok których nie można przejść obojętnie. W związku z powyższym, korzystam z przysługującego mi prawa do skierowania rozprawy doktorskiej

mgr Agnieszki Troszok do poprawy, zgodnie z wymogami określonymi w art. 13 ust. 1 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.

Uwagi dotyczące rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Troszok:

1. Brak cytowania i powołania się na wieloautorskie publikacje własne, w których Doktorantka opublikowała wyniki umieszczone w prezentowanej monografii/rozprawie doktorskiej.
2. Przedstawienie oświadczenia określającego indywidualny wkład w powstanie pracy doktorskiej oraz oświadczeń pozostałych współautorów opublikowanych w 2018 r. i 2019 r. prac, z podaniem wkładu wyrażonego w procentach, w powstanie publikacji.
3. Sformułowanie wniosków końcowych wynikających z przeprowadzonych badań.

Lublin, 30 stycznia 2020 r.



Dr hab. Leszek Guz