

Siedlce, dn. 11.02.2025 r.

Dr hab. Katarzyna Andraszek, profesor uczelni
Uniwersytet w Siedlcach
Wydział Nauk Rolniczych
Instytut Zootechniki i Rybactwa
Ul. Prusa 14
08-110 Siedlce
e-mail: katarzyna.andraszek@uws.edu.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Ilony Mazurkiewicz

**pt. „Polimorfizm molekularny genów odporności na choroby
wirusowe u norki amerykańskiej (*Neovison vison*)”**

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Genetyki Ogólnej i Molekularnej pod opieką naukową Pana prof. dr. hab. Andrzeja Jakubczaka

Podstawą opracowania niniejszej opinii są:

- pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Prof. dr hab. Brygidy Ślaskiej z dnia 18.12.2024r powierzające mi opracowanie oceny rozprawy doktorskiej oraz stwierdzenie, czy rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w odpowiedniej ustawie,
- przesłana rozprawa doktorska Pani mgr Ilony Mazurkiewicz według klasycznego układu w postaci monografii naukowej.

Ocenę rozprawy wykonano zgodnie z wymogami określonymi w Ustawie z dn. 20 lipca 2018 r, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023r. poz. 742, ze zm.). Przedstawiona do recenzji praca spełnia warunki formalne określone w w.w. Ustawie określone w art. 187 ust. 1 i 2.

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została sporządzona jako monografia naukowa, z uwzględnieniem wszystkich niezbędnych rozdziałów. Recenzowana rozprawa doktorska liczy 151 stron maszynopisu. W spisie treści zawiera 7 ponumerowanych rozdziałów oraz Streszczenie wraz ze słowami kluczowymi w języku polskim i angielskim a także rozdział Załączniki. Poszczególne rozdziały to: 1. Wstęp (s. 10 - 35), 2. Cel i hipotezy badawcze (s. 36 - 37), 3. Materiał i metody - rozdział podzielony na 6 podrozdziałów (s. 39 -53), 4. Wyniki – rozdział podzielony na 7 podrozdziałów (s. 54 - 103), 5. Dyskusja (s. 104 – 125), 6.

Podsumowanie i wnioski (s. 126 – 127) oraz 7. Bibliografia (s. 128 - 147). W bibliografii wykazanych jest 198 pozycji piśmiennictwa ściśle związanych z tematyką pracy. Rozprawa zawiera 20 tabel oraz 39 rycin. Poszczególne rozdziały i podrozdziały tworzą logiczną całość. Układ pracy jest konwencjonalny, typowy dla prac badawczych na stopień naukowy i z formalnego punktu widzenia nie budzi zastrzeżeń. Od strony edytorskiej praca jest niezwykle staranna, co zasługuje na uwagę. Ponadto napisana jest poprawnym stylistycznie językiem. W moim odczuciu brakuje wykazu zastosowanych skrótów, co ułatwiłoby czytanie monografii.

Ocena merytoryczna

Zagadnienia poruszane w pracy mieszczą się w zakresie dyscypliny zootechnika i rybactwo, a podjęta tematyka badawcza jest ważna zarówno poznawczo, jak i aplikacyjnie. Autorka skupiła się na kompleksowej analizie wytypowanych na podstawie literatury genów norki odpowiadających za procesy odpornościowe głównie w odniesieniu do choroby aleuckiej wywołanej wirusem AMDV. Jest to groźna choroba zakaźna głównie ze względu na ostry przebieg i wysoką śmiertelność wśród młodych osobników. Choroba bardzo łatwo rozprzestrzenia się w stadach, a wywołujący ją wirus charakteryzuje się wysoką trwałością w środowisku. Obecnie nie istnieje szczepionka przeciwko AMDV. Wytypowane przez Doktorantkę geny mogą pełnić rolę prognostycznych markerów odpowiedzi immunologicznej nerek na zakażenie wirusem oraz być swoistymi kandydatami do selekcji nerek tolerujących chorobę aleucką.

Tytuł przedłożonej rozprawy doktorskiej sformułowany przez Doktorantkę odzwierciedla zakres prowadzonych przez nią prac badawczych.

Streszczenie w języku polskim oraz angielskim zostało zredagowane w przejrzysty sposób. Zawiera jasno zaznaczony cel, zakres pracy, uzyskane wyniki i ich podsumowanie. Właściwie dobrano **słowa kluczowe** charakteryzujące tematykę rozprawy doktorskiej.

W rozdziale pierwszym – **Wstęp** – Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy doktorskiej uzasadniając podjęcie tematu badawczego. Rozdział merytorycznie uzasadnia podjęte badania oraz w sposób interesujący przedstawia dotychczasowy stan wiedzy na temat choroby aleuckiej uzupełniając go o charakterystykę gatunku oraz odpowiedź immunologiczną na zakażenie AMDV. Na uwagę zasługuje tutaj podrozdział dotyczący genomu norki amerykańskiej, który Doktorantka opisała zarówno pod kątem genomiki, jak i cytogenetyki oraz podrozdział dotyczący charakterystyki molekularnej i lokalizacji genów wytypowanych jako te, odpowiadające za procesy odpornościowe u norki amerykańskiej. Ta część rozprawy napisana jest poprawnym stylistycznie językiem z dokładnym opisaniem poruszanej w dalszej części pracy tematyki. Doktorantka bardzo merytorycznie i gruntownie opisuje przedmiotowe zagadnienia. Ten fakt i poprawna polszczyzna sprawiają, że rozdział **Wstęp** czyta się naprawdę komfortowo. Wskazanym byłoby, aby po przeredagowaniu, opublikować tę część pracy, jako artykuł przeglądowy. Cytowane w tej części pracy piśmiennictwo jest całkowicie zgodne z celem i tematyką rozdziału. Zwraca uwagę swoją obszernością, co świadczy o szerokim odczuciu Autorki.

W rozdziale drugim – **Cel i hipotezy badawcze** – Autorka formułuje właściwie dwa cele oraz hipotezę nadrzędną, która zakłada, że u badanych zwierząt mogą znajdować się osobniki, w genomie których występują polimorfizmy molekularne predysponujące je do

odporności na choroby wirusowe. W pracy podjęto także weryfikację sześciu roboczych hipotez badawczych, w stosunku do których sformułowano szczegółowe cele badawcze.

Rozdział trzeci – **Materiał i metody** – w sposób niezwykle precyzyjny prowadzi czytelnika przez materiał badawczy i diagnostykę AMDV oraz metody molekularne, sekwencjonowanie i analizę bioinformatyczną. Ten rozdział podzielony jest na 6 podrozdziałów, z których cztery mają wydzielone dodatkowo etapy poszczególnych analiz. Autorka precyzyjnie opisuje poddane analizie zwierzęta, pobrany od nich materiał badawczy oraz kolejne analizy laboratoryjne i bioinformatyczne. W tym miejscu należy podkreślić kompleksowość wykonanych badań oraz wzajemną komplementarność poszczególnych elementów pracy. Zastosowane metody i analizy są ogólnie przyjęte w tego typu badaniach naukowych. Na uwagę zasługuje staranny opis poszczególnych procedur i możliwość niemal ich natychmiastowego przełożenia na podobne analizy np. u innych gatunków zwierząt. Stwierdzam, że metody badań opisane w tej pracy nie budzą zastrzeżeń i nie wnoszą żadnych uwag do tego rozdziału.

Uzyskane rezultaty badań zestawione są w rozdziale czwartym – **Wyniki**. Rozdział ten jest podzielony na 7 podrozdziałów, które nawiązują tematycznie do podrozdziałów wyodrębnionych w metodyce pracy. Autorka w sposób kompleksowy, poprawny i zrozumiały opisuje wyniki procedur laboratoryjnych. Na szczególną uwagę zasługuje opis polimorfizmów zidentyfikowanych w obrębie wytypowanych do analizy genów *SRSF5*, *RNF165* i *SKOR2*. Są to kompleksowe analizy genomiczne, proteomiczne oraz bioinformatyczne. Rozdział wzbogacony jest w liczne tabele i ryciny, które ułatwiają śledzenie otrzymanych przez Doktorantkę wyników analiz. Pomimo ogromnej liczby terminów molekularnych rozdział czyta się komfortowo, co potwierdza, że Autorka w sposób swobodny porusza się w tematyce szeroko pojętej genomiki. Poszczególne treści są uporządkowane i wynikające z siebie w sposób bezpośredni.

Na uwagę zasługuje bardzo dobrze napisany rozdział **Dyskusja**, w którym Doktorantka porównuje uzyskane wyniki badań własnych z efektami eksperymentów innych badaczy. Co ważne, zwraca także uwagę na unikatowość swoich badań. W związku z rozbudowanym rozdziałem Wyniki, wydawać by się mogło, że rozdział Dyskusja będzie trudny do opracowania. Doktorantka poradziła sobie doskonale przeprowadzając logiczne wyjaśnienia swoich badań i obserwacji, a także wskazała kierunek dalszych ewentualnie możliwych do podjęcia zadań badawczych. Ważne jest także to, że rozdział dyskusja nie zamyka poruszanych w pracy tematów, a jest rodzajem bramy otwierającej się na dalsze dociekania naukowe. W rozdziale tym Doktorantka bardzo swobodnie porusza się na płaszczyźnie genetyki molekularnej, genomiki, epigenetyki, proteomiki i bioinformatyki, co świadczy o jej ogromnym odczytaniu i swoistym wycuciu naukowym.

Na zakończenie w rozdziale **Podsumowanie i wnioski** Doktorantka sformułowała dziesięć wniosków, które odpowiadają założonym celom i weryfikują hipotezy badawcze. Wszystkie wnioski mają swoje uzasadnienie i wynikają wprost z przeprowadzonych analiz molekularnych i bioinformatycznych.

Za niewątpliwe zalety ocenianej rozprawy doktorskiej uważam wybór stale aktualnego tematu badań, wybór nowoczesnych metod badawczych, które są adekwatne do celu pracy i hipotez badawczych. Wyniki zostały poprawnie zinterpretowane i dyskutowane na tle aktualnej literatury. Wnioskowanie przeprowadzone właściwie. Moja ocena rozprawy Pani mgr

Ilony Mazurkiewicz jest wysoka. Praca została napisana poprawnym językiem, z prawidłowo użytą najnowszą nomenklaturą genetyczną. Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej listę drobnych niedociągnięć oraz uwag dotyczących warstwy redakcyjnej rozprawy. Sugestie i uwagi pogrupowałam według rozdziałów pracy, których dotyczą.

W rozdziale Wstęp brakuje mi wydzielonego podrozdziału poświęconego chorobie aleuckiej. W podrozdziale 1.4. Najważniejsze choroby wirusowe występujące u nerek amerykańskich – jest tylko wspomniane, że AMDV jest drugą pod względem liczebności przyczyną zgonów nerek. Natomiast w tym rozdziale na uwagę zasługuje dokładna charakterystyka molekularna pozostałych wirusów patogennych dla nerek. Szeroki opis choroby i bardzo dobrze scharakteryzowany wirus pojawia się w podrozdziale 1.5. Odporność nerek na przykładzie choroby aleuckiej. Sugerowałabym wyodrębnienie rozdziału poświęconego chorobie aleuckiej i połączenie w jeden podrozdział treści zawartych w podrozdziałach 1.5. i 1.6., w których opisana jest reakcja organizmu nerek na zakażenie AMDV. W podrozdziale 1.8. występują określenia „test jodowy” i „test jodłowy”, czy to literówka, czy różne testy? W podrozdziale 1.9. trochę niezrozumiałe i wymagające przeredagowania jest zdanie: „Stwierdzili, że ludzkie chromosomy mają tylko 34 segmenty zbieżne z kariotypem norki., natomiast wykazali, że układ u nerek podobny do układu znalezione u kota, potwierdzając w ten sposób wysoki konserwatyzm kariotypu opisany dla *Feloidae*.” Ponadto określenie „znaleziony” odnośnie układu segmentów konserwatywnych w obrębie chromosomów jest niefortunne. Prosiłabym także o wyjaśnienie skrótu/symbolu N50 w zdaniu: „Jednak ten projekt był bardzo pofragmentowany i składał się z 7175 rusztowań z N50 wynoszącym 6,3Mb”. To zdanie również znajduje się w podrozdziale 1.9, na stronie 27. Sugerowałabym także przeredagowanie zdania z tego samego podrozdziału: „Złożenie genomu norki amerykańskiej (ASM_NN_V1) miało długość 2,68 Gb, w którym około 98,6% całego genomu było pokryte przez 15 chromosomów”. Genom znajduje się w chromosomach, a nie chromosomy pokrywają genom.

W rozdziale Bibliografia brakuje następujących pozycji zacytowanych w tekście:

1. Aasted i Leslie, 1991.
2. Anistoroaei i wsp., 2012.
3. Christensen i wsp., 1999.
4. Grabowska i Adamczyk-Popławska, 2021.
5. Hussain i wsp., 2024
6. Jakubczak i wsp., 2017.
7. Jensen i wsp., 2011.
8. Knuuttila i wsp., 2014
9. Porter i wsp., 1980.
10. Prieto i wsp., 2018.
11. Stanford i wsp., 2005.
12. Tong i wsp., 2020.
13. Yukari i wsp., 2010.

Natomiast w dysertacji brak jest niektórych publikacji zamieszczonych w spisie.

1. Aasted, B., Viuff, B. (2007). Reactivity of monoclonal antibodies to human CD antigens with cells from mink. *Veterinary immunology and immunopathology*, 119(1-2), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.025>
2. Aasted, B.E.N.T., Bloom, M. E. (1983). Sensitive radioimmune assay for measuring Aleutian disease virus antigen and antibody. *Journal of Clinical Microbiology*, 18(3), 637-644. <https://doi.org/10.1128/jcm.18.3.637-644.1983>
3. Alexandersen, S. (1990). Pathogenesis of disease caused by Aleutian mink disease parvovirus. *APMIS. Supplementum*, 14, 1-32.
4. Alexandersen, S., Larsen, S., Aasted, B., Uttenthal, A., Bloom, M. E., Hansen, M. (1994). Acute interstitial pneumonia in mink kits inoculated with defined isolates of Aleutian mink disease parvovirus. *Veterinary Pathology*, 31(2), 216-228. <https://doi.org/10.1177/030098589403100209>
5. Andersson, A.M., Wallgren, P. (2013). Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of Aleutian mink disease virus infection in mink. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 86 (2013). <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-86>
6. Blomström, A. L., Widén, F., Hammer, A. S., Belák, S., Berg, M. (2010). Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4392-4396. <https://doi.org/10.1128/jcm.01040-10>
7. Caballero, S., Guix, S., Ribes, E., Bosch, A., Pintó, R. M. (2004). Structural requirements of astrovirus virus-like particles assembled in insect cells. *Journal of Virology*, 78(23), 13285-13292. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.23.13285-13292.2004>
8. Englund, L., Chriel, M., Dietz, H.H., Hedlund, K.O. (2002). Astrovirus epidemiologically linked to pre-weaning diarrhoea in mink. *Veterinary Microbiology*, 85 (1): 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00472-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00472-2)
9. Gavier-Widen, D., Brojer, C., Dietz, H.H., Englund, L., Hammer, A.S., Hedlund, K.O., Hård af Segerstad, C., Nilsson, K., Nowotny, N., Puurula, V., Thorén, P., Uhlhorn, H., Weissenböck, H., Agren, E., Klingeborn, B. (2004). Investigations into shaking mink syndrome: an encephalomyelitis of unknown cause in farmed mink (*Mustela vison*) kits in Scandinavia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16 (4): 305-312. <https://doi.org/10.1177/104063870401600408>
10. Lu, T., Zhang, H., Zhou, J., Ma, Q., Yan, W., Zhao, L., Wu, S., Chen, H. (2021) Aptamer-targeting of Aleutian mink disease virus (AMDV) can be an effective strategy to inhibit virus replication. *Scientific Reports*, 11(1), 4649. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84223-8>
11. Mittelholzer, C., Hedlund, K.O., Englund, L., Dietz, H.H., Svensson, L. (2003). Molecular characterization of a novel astrovirus associated with disease in mink. *Journal of General Virology*, 84(11), 3087-3094. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19267-0>

Publikacja: Jensen, T.H., Chriél, M., Hansen, M.S. (2015). Progression of experimental chronic Aleutian mink disease virus infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0214-7> jest powielona w wykazie.

W przypadku kilku publikacji tego samego autora lub autora i współpracowników wskazane byłoby zestawianie takich publikacji w wykazie chronologicznie.

Z uwagi na dużą liczbę tabel (20) i rycin (39) zamieszczonych w pracy brakuje mi podrozdziałów: Spis tabel i Spis rycin.

W swojej pracy Doktorantka sformułowała dwa cele badawcze, jedną hipotezę nadrzędną i 6 roboczych hipotez badawczych. Z punktu widzenia czytelnika sugeruję, aby w rozdziale podsumowanie i wnioski uwidocznic, który wniosek odnosi się do konkretnego celu i hipotezy nadrzędnej.

Doktorantka nie ustrzegła się przed pewnymi skrótami myślowymi, drobnymi błędami stylistycznymi, interpunkcyjnymi oraz usterkami głównie o charakterze redakcyjnym.

Wszystkie wymienione powyżej uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy i nie wpływają na jej pozytywną ocenę. Praca wnosi wiele ciekawych elementów zarówno poznawczych, jak i praktycznych. Mam nadzieję, że uwagi będą pomocne dla Doktorantki podczas przygotowywania rozprawy do opublikowania. Jeszcze raz pragnę podkreślić, że uzyskane w recenzowanej pracy wyniki stanowią bardzo cenne źródło wiedzy i mogą stanowić inspirację do dalszych badań. Doceniam wartość naukową uzyskanych wyników oraz fakt opanowania przez Doktorantkę technik molekularnych, analizy uzyskanych wyników i metod bioinformatycznych. Z pełnym przekonaniem oceniam, że rozprawa doktorska potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Panią mgr Ilonę Mazurkiewicz.

Wniosek końcowy

Reasumując wyrażam opinię, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Ilony Mazurkiewicz jest wartościowym opracowaniem naukowym, reprezentuje wysoki poziom merytoryczny, poszerza zakres wiedzy na temat molekularnych uwarunkowań choroby aleuckiej oraz polimorfizmów molekularnych wybranych genów odpowiadających za procesy odpornościowe. W pracy wykorzystano właściwe, nowoczesne metody badawcze, pozwalające na przeprowadzenie badań i uzyskanie wiarygodnych wyników. Oceniana rozprawa doktorska wnosi duży wkład w rozwój nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo oraz posiada duże znaczenie aplikacyjne. Wykonana przez Doktorantkę praca doświadczalna stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i dowodzi, że Autorka posiada ogólną i szczegółową wiedzę teoretyczną i potrafi samodzielnie prowadzić badania i rozwiązywać problemy eksperymentalne.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Ilony Mazurkiewicz nt. „Polimorfizm molekularny genów odporności na choroby wirusowe u norki amerykańskiej (*Neovison vison*)” wykonana pod kierunkiem Pana prof. Dr hab. Andrzeja Jakubczaka wnosi nowe elementy naukowo-poznawcze, jak i aplikacyjne oraz w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2023 r., poz. 742, ze zm.). Biorąc powyższe pod uwagę przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek

o dopuszczenie Pani mgr Ilony Mazurkiewicz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.

Doświadczenia przeprowadzone przez Doktorantkę mają charakter badań kompleksowych, wymagających dużego zaangażowania. Uwzględniając wysoką wartość naukową uzyskanych wyników oraz ich charakter aplikacyjny składam wnioszek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa Pani mgr Ilony Mazurkiewicz pt. „Polimorfizm molekularny genów odporności na choroby wirusowe u norki amerykańskiej (*Neovison vison*)”

Kanduszek