

Prof. dr hab. Brygida Ślaska

Lublin, dn. 15.10.2020 r.

Zakład Genetyki Ogólnej i Molekularnej

Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Szostak pt.: „*Effect of a diet enriched with omega-6 and omega-3 fatty acids on the pig liver transcriptome*” (“Wpływ diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe omega-6 i omega-3 na transkryptom wątroby świni”) wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dra hab. Mariusza Pierzchały oraz dra Marinus F.W. te Pas z Wageningen University and Research Centre w Holandii.

Wyniki badań z zakresu genomiki funkcjonalnej zwierząt hodowlanych mają ważne znaczenie w naukach zootechnicznych. Znaczący wzrost produktywności zwierząt gospodarskich, który miał miejsce w ubiegłym wieku, był możliwy dzięki zastosowaniu osiągnięć nauk zootechnicznych, w tym dokonań w zakresie genetyki i genomiki zwierząt. Jeden z kierunków badań w obszarze genomiki funkcjonalnej obejmuje nutrigenomikę, która obecnie zajmuje ważne miejsce w piśmiennictwie światowym, głównie w aspekcie badań biomedycznych człowieka, ale również w ostatnich latach – zwierząt hodowlanych.

Temat wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT) omega-3 i omega 6 jest często i szeroko poruszany w aspekcie zdrowia człowieka, ale także hodowli zwierząt gospodarskich. WNKT mają istotne znaczenie w komórce. Są ważnym składnikiem strukturalnym błon komórkowych, stanowią źródło energii dla tkanek i narządów, ale też pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych, które mogą wpływać na regulację ekspresji genów. WNKT omega-3 i omega-6 są przedmiotem zainteresowania w aspekcie żywienia ludzi i zwierząt przede wszystkim z powodu korzystnego działania kwasów omega-3 u pacjentów z problemami kardiologicznymi oraz przewlekłymi chorobami zapalnymi. Obecnie wiele badań koncentruje się na zagadnieniach z zakresu nutrigenomiki, czyli systemowych zmianach ekspresji genów zależnych od składników diety na różnych poziomach (transkryptomicznym, proteomicznym i metabolomicznym) w celu wyjaśnienia wielokierunkowych mechanizmów ich działania. Zastosowanie metod transkryptomicznych w badaniach z zakresu nutrigenomiki jest nadal ograniczone. Jednak jest coraz bardziej oczywiste, że różne spożycie i skład kwasów tłuszczowych w diecie mają istotny wpływ na



regulację mechanizmu kontroli homeostatycznej i adaptację komórkową poprzez regulację transkrypcji genów. Przedstawiona mi do recenzji praca wpisuje się w światowe trendy naukowe i w sposób znaczący poszerza wiedzę z zakresu genomiki funkcjonalnej, a w szczególności nutrigenomiki świń.

Mechanizmy biologiczne, jakie zachodzą w wątrobie pod wpływem stosowania w diecie świń pasz o wysokiej zawartości kwasów omega-6 i omega-3 nie są do końca znane, a wiadomo, że związek między nimi, a procesami fizjologicznymi zachodzącymi w wątrobie istnieje. Dlatego też uważam, że badania podjęte przez Doktorantkę są w pełni uzasadnione. Mają one istotne znaczenie dla poznania procesów zachodzących w wątrobie świń pod wpływem suplementacji dawki pokarmowej kwasami tłuszczowymi omega-6 i omega-3. Ich wyniki są wartościowe ze względów poznawczych dla świń, ale też można je wykorzystać w lepszym wyjaśnieniu m.in. zaburzeń metabolicznych u człowieka. Badania podjęte w ocenianej rozprawie, na populacji ludzkiej nie są możliwe, z uwagi na względy etyczne. Natomiast świnia jest w wielu aspektach traktowana jako organizm modelowy dla człowieka. W mojej opinii otrzymane w pracy wyniki są w tym względzie szczególnie wartościowe i możliwe do wykorzystania nie tylko u świń, ale i w badaniach biomedycznych.

Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że tematyka rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Szostak jest aktualna i wartościowa a wybór tematu – trafny i w pełni uzasadniony.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Oceniana praca została przygotowana w postaci monografii w języku angielskim zgodnie z zasadami przyjętymi dla klasycznej rozprawy naukowej. Liczy 191 stron, na których zawarto 39 tabel i 55 rysunków. Rozprawa doktorska jest niezmiernie obszerna, jednak z uwagi na wielopłaszczyznowy charakter badań i imponującą ilość istotnych, nowatorskich wyników – jest to uzasadnione. Wprawdzie można podnosić, że niektóre tabele o objętości czterech do dwunastu stron mogłyby się znaleźć w materiałach uzupełniających, jednak rozumiem i szanuję decyzję Doktorantki o umieszczeniu tabel w części wynikowej pracy, ponieważ z całą pewnością każdy z otrzymanych rezultatów był dla niej istotny. Niewątpliwie podczas przygotowywania pracy do druku informacje zawarte w tabelach zostaną przedstawione w bardziej syntetyczny sposób lub tabele te znajdą się w plikach uzupełniających, a nie w tekście artykułów. Opracowanie ma przemyślaną strukturę i układ typowy dla eksperymentalnych rozpraw doktorskich. Składa się z sześciu głównych rozdziałów (*Wstęp, Cele badawcze, Material i metody, Wyniki, Dyskusja oraz Wnioski*), oraz wykazu cytowanego piśmiennictwa źródłowego. Do pracy dołączono również streszczenie w języku polskim i angielskim oraz z uwagi na objętość pracy – zasadnie wyodrębnione *materiały uzupełniające* w postaci plików *Excel* z dwunastoma tabelami (S1-S12) odnoszącymi się do części wynikowej pracy. Dysertacja została napisana z zachowaniem właściwej sekwencji opisu, w której zawarte informacje przedstawione są w sposób uporządkowany.

Wprowadzeniem do rozprawy jest liczący 17 stron komputeropisu *Wstęp* nakreślający,

na tle bogatego piśmiennictwa, problematykę związaną z założonymi w pracy celami badań. Rozdział ten prawidłowo podzielony został na podrozdziały, w których mgr Agnieszka Szostak już na wstępie przedstawiła hipotezy badawcze. Doktorantka podjęła zadanie uzupełnienia brakujących w piśmiennictwie informacji i przeprowadzenia serii doświadczeń mających na celu weryfikację sformułowanych przez nią trzech szeroko nakreślonych hipotez badawczych. W dalszej części *Wstępu*, Doktorantka z wykorzystaniem właściwie dobranych artykułów naukowych, scharakteryzowała wielonienasycone kwasy tłuszczowe pod względem biochemicznym i funkcjonalnym, jak też wyjaśniła ich znaczenie w diecie zwierząt i człowieka. Zasadnie też opisała znaczenie świni, jako modelu w badaniach biomedycznych człowieka. W tej części Autorka przedstawiła również zastosowanie technik transkryptomicznych w badaniach z zakresu nutrigenomiki, co było w pełni uzasadnione. W tym rozdziale mgr Agnieszka Szostak wykazała się bardzo dobrą orientacją w problematyce z szerokiego zakresu tematyki podjętych badań, co świadczy o solidnym teoretycznym przygotowaniu Autorki do prowadzenia analiz.

Właściwy dobór pozycji piśmiennictwa pozwolił Autorce wytyczyć dwa jasno sprecyzowane i prawidłowo sformułowane cele dysertacji, oraz 12 celów szczegółowych odzwierciedlających poszczególne etapy przeprowadzonych badań. Głównym celem pracy było prześledzenie zmian w transkryptomie wątroby świni będących efektem diety wzbogaconej w WNKT omega-6 i omega-3 poprzez analizę różnic poziomu ekspresji genów w wątrobie oraz ścieżek metabolicznych powiązanych z dwoma pulami genowymi świń (rasę polską białą zwisłouchą oraz krzyżówkę świń zwisłouchych i duroc). Podkreślić należy wartość celu rozprawy, ponieważ jego realizacja, prowadząca do otrzymania w dużej części pionierskich wyników, wymagała od Autorki znajomości wielu metod i technik z zakresu genomiki funkcjonalnej, ale też zgłębienia zagadnień i programów bioinformatycznych i biostatystycznych.

W rozdziale *Material i metody* mgr Agnieszka Szostak przedstawiła uwzględniony w badaniach prawidłowo wybrany i skolekcjonowany materiał badawczy i zastosowane techniki molekularne, należące do najnowocześniejszych technik wykorzystywanych w badaniach nutrigenomicznych. Szczegółowo opisała też analizy bioinformatyczne jak też biostatystyczne. Doświadczenie zostało przeprowadzone na dwóch populacjach świń (1) rasy polska biała zwisłoucha (PBZ) oraz (2) jej krzyżówce z rasą duroc, różniących się między sobą otluszczeniem oraz profilem kwasów tłuszczowych w tkankach. Zwierzętom podawano paszę wzbogaconą w WNKT omega-6 i omega-3 (początkowo testowano trzy diety) lub paszę standardową (kontrola). Profile kwasów tłuszczowych w wątrobie przeanalizowano za pomocą chromatografii gazowej. Na uwagę zasługuje wykonanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) metodą sekwencjonowania transkryptomu (RNA-Seq) aż dla 22 osobników. Jest to metoda, która jest kosztochłonna, a opracowanie otrzymanych wyników jest czasochłonne i wymaga znajomości obsługi nietrywialnych programów bioinformatycznych oraz wysokiego poziomu wiedzy z zakresu genomiki funkcjonalnej. Metodologia eksperymentu NGS wykonanego na tych próbach nie budzi żadnych zastrzeżeń. Bioinformatyczne analizy porównawcze odczytów RNA-Seq między rodzajem diety i genotypem świń pozwoliły na identyfikację genów ulegających istotnie zmienionej ekspresji (DEGs; *differentially expressed*



genes). Zastosowano prawidłowe podejście do wyznaczenia biologicznych interakcji pomiędzy sieciami genów i ścieżkami metabolicznymi na podstawie zidentyfikowanych genów ulegających istotnie zmienionej ekspresji. Wyniki sekwencjonowania transkryptomu (RNA-Seq) potwierdzono za pomocą ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR), co było prawidłowym podejściem weryfikacyjnym.

Autorka starannie zaplanowała i wykonała część doświadczalną pracy. Godnym uznania jest skrupulatny opis analiz laboratoryjnych. Informacje zawarte w tym rozdziale wskazują, że doświadczenie zostało zaprojektowane i przeprowadzone właściwie, z uwzględnieniem prawidłowo wybranych metod badawczych. Należy również zwrócić uwagę na ogromną czaso- i pracochłonność zastosowanych w pracy technik, jak też analiz bioinformatycznych i biostatystycznych. Materiał i metody opisane zostały w sposób precyzyjny i możliwy do odtworzenia. Dobór materiału, zakres analizowanych parametrów oraz metody badawcze są właściwe w kontekście przyjętych celów badawczych.

W rozdziale *Wyniki* Autorka przedstawiła uzyskane rezultaty z kolejnych etapów badań w uporządkowany sposób. Wyniki zestawiono w 23 tabelach (oraz 12 tabelach w materiałach uzupełniających) i na 50 rysunkach. Zaprezentowano je w logiczny i konsekwentny sposób, natomiast ich układ jest komunikatywny. Wyniki rozprawy, o istotnym znaczeniu poznawczym, odpowiedziały na postawione cele pracy. Autorka w doświadczeniu żywieniowym stwierdziła, że spośród trzech testowanych pasz, pasza wzbogacona w WNKT w ilości 2% oleju lnianego i 1% oleju rzepakowego skutecznie zmieniła profil kwasów tłuszczowych w wątrobie, zmniejszając proporcję kwasów omega-6/omega-3 zarówno dla rasy PBZ (z 32,73 do 4,25; $p < 0,001$) jak i PBZ x duroc (z 14,42 do 4,74; $p < 0,01$). Do tej części doświadczenia mam kilka pytań:

Pomimo ogromnej ilości przeprowadzonych badań, w eksperymencie żywieniowym zabrakło mi czwartej grupy żywionej paszą wzbogaconą w WNKT w ilości 2% oleju lnianego. Czy zdaniem Autorki takie podejście byłoby zasadne?

Interesujące również byłoby uzyskanie odpowiedzi na pytanie, jaki jest wpływ wzbogaconej w WNKT diety na cechy gospodarczo ważne świń. Czy można go ocenić wykorzystując wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie?

Czy Doktorantka bierze pod uwagę kontynuację badań, na podstawie uzyskanych wyników, w aspekcie wartości odżywczych i prozdrowotnych uzyskiwanych produktów od zwierząt suplementowanych nienasyconymi kwasami tłuszczowymi, w tym między innymi uzyskiwanymi z podrobów wieprzowych? – tematu rzadko poruszanego, acz w mojej opinii ważnego.

Autorka dowiodła, że zmienione profile kwasów tłuszczowych w wątrobie wpłynęły na ekspresję genów na poziomie transkryptomu zarówno dla rasy PBZ jak i mieszańców międzyrasowych. Poprzez porównanie genów ulegających różnej ekspresji (DEGs) regulowanych w górę i w dół, podczas analiz porównawczych zidentyfikowała sieci genów i ścieżki metaboliczne specyficzne dla diety i genotypu. Otrzymane wyniki zmienionych ścieżek potwierdziły antystłuszczeniową funkcję kwasów tłuszczowych omega-3 w wątrobie.

Autorka stwierdziła, że endogenne kwasy tłuszczowe omega-3 wpłynęły na ścieżki fizjologiczne zaangażowane głównie w procesy związane ze zmniejszoną akumulacją lipidów w komórce. Mgr Agnieszka Szostak potwierdziła istotną rolę kwasów tłuszczowych omega-6 i omega-3 w homeostazie poprzez znacząco zmieniony profil kwasów tłuszczowych w wątrobie, a w następstwie regulację ekspresji wielu genów zaangażowanych w metabolizm lipidów, przekaznictwo sygnałowe oraz ścieżek związanych z odpowiedzią zapalną.

Nowatorstwo większości wyników badań otrzymanych przez Doktorantkę jest niekwestionowane. Przeprowadziła ona analizy wielkoskalowe genomu – badania aktywności transkrypcyjnej całego genomu świni z wykorzystaniem najnowocześniejszych technik w aspekcie badań nutrigenomicznych, które obecnie są jednym z szeroko badanych i dyskutowanych zagadnień w piśmiennictwie światowym. Podejście analizy wielkoskalowej genomu, pomimo nielicznych doniesień analiz aktywności transkrypcyjnej poszczególnych genów w wątrobie świń, jest pionierskie w odniesieniu do piśmiennictwa międzynarodowego. Nowatorskie podejście tyczy się również wykorzystania do badań transkryptomu wątroby świń dwóch populacji różnych pod względem genetycznym i fenotypowym (rasa PBZ oraz krzyżówka świń zwislouchych i duroc), co jest nie bez znaczenia dla wykorzystania uzyskanych wyników w badaniach biomedycznych człowieka.

Interpretacja wyników na tle piśmiennictwa świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu mgr Agnieszki Szostak do problemu badawczego podjętego w pracy doktorskiej. Dyskusja jest zwięzła, merytoryczna i skoncentrowana wokół wyników. Autorka zacytowała 160 anglojęzycznych pozycji piśmiennictwa publikowanych w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Potwierdzeniem aktualności tematyki badawczej jest fakt, że niemal 80% cytowanych przez Doktorantkę prac ukazało się w periodykach naukowych w ostatnich dziesięciu latach. Poszczególne pozycje w spisie piśmiennictwa zostały przedstawione w kolejności cytowania ich w tekście pracy, a nie alfabetycznie. Wydaje się, że przy tej długości pracy lepszym podejściem byłby układ alfabetyczny artykułów, ale zastosowana przez Autorkę kolejność pozycji piśmiennictwa jest również praktykowana, więc jest to sprawa dyskusyjna. Oceniając treść merytoryczną rozdziału *Dyskusja* stwierdzam, że mgr Agnieszka Szostak wykazała się bardzo dobrą orientacją w piśmiennictwie naukowym dotyczącym problematyki badań oraz umiejętnością jego wykorzystania przy dyskusji własnych rezultatów. Lektura rozdziału skłania do stwierdzenia, że Autorka w pełni odpowiedziała na postawione cele pracy a opis wyników i ich dyskusja są kompletne.

Rozprawę kończy rozdział *Wnioski* uzasadniający otrzymane wyniki i odpowiadający na postawione cele pracy. Wnioski są poprawne, tak w kontekście wyników, jak i w świetle dyskusji.

Moja ogólna ocena wartości merytorycznej pracy jest wysoka. W uzasadnieniu podkreślić należy szeroki zakres badań i fakt, że praca wnosi nowe wartości poznawcze, które znacząco poszerzyły wiedzę z zakresu nutrigenomiki świń, ale też w aspekcie wykorzystania modelu świni w badaniach biomedycznych człowieka. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością planowania i przeprowadzenia eksperymentu badawczego oraz

umiejętnością analizy uzyskanych wyników. Autorka podjęła się pracochłonnego zadania, w którym założone cele badań zostały w pełni zrealizowane.

Podkreślić należy, że drobne sugestie, które zawarłam w recenzji są raczej dyskusją powstałą w trakcie zgłębiania wyników i w żaden sposób nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Szostak.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Szostak, pt.: „*Effect of a diet enriched with omega-6 and omega-3 fatty acids on the pig liver transcriptome*” (“Wpływ diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe omega-6 i omega-3 na transkryptom wątroby świni”) **spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim** określone w *Ustawie* z dn. 14. marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr. 65 z 2003r., z późn. zm.), natomiast Doktorantka wykazała wszelkie umiejętności niezbędne dla otrzymania stopnia doktora nauki, a niniejsza **rozprawa może stanowić podstawę do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo**. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu **wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Szostak do dalszych etapów przewodu doktorskiego**.

Brygida Sule