

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt.

Effect of a diet enriched with omega-6 and omega-3 fatty acids on the pig liver transcriptome

autorstwa **Agnieszki Szostak**

ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie Zootechnika i rybactwo,
przygotowana na wniosek Dyrektora Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN
prof. dr hab. Agnieszki Wierzbickiej

Przedstawiona rozprawa doktorska ma formę nieopublikowanej monografii naukowej liczącej 191 stron, przygotowanej w języku angielskim, z dołączonym streszczeniem w języku polskim oraz materiałami uzupełniającymi.

Wybór tematu badań jest prawidłowy. Autorka przedstawiła badanie wpływu wariantu żywienia świń z zastosowaniem karmy wzbogaconej w kwasy tłuszczowe pochodzenia roślinnego na funkcjonowanie genomu w obrębie wątroby. Tematyka dotyczy podstawowego w kraju i na świecie gatunku użytkowego i wpisuje się w obszar badań nad biologicznymi podstawami zootechniki. Temat mieści się w nurcie nowoczesnych badań nutrigenomicznych, które w przyszłości mogą przełożyć się na nowe metody optymalizacji żywienia świń. Badania stanowią jednocześnie przykład doświadczenia nutrigenomicznego ważnego dla biologii człowieka, co można traktować jako ocenę przydatności świni domowej jako gatunku modelowego pomagającego ominąć ograniczenia etyczne badań medycznych nad otyłością poligeniczną młodzieży i chorobami powiązanymi.

Badanie naukowe opisane w rozprawie jest prawidłowe pod względem układu doświadczenia, materiału i metod. Przeprowadzone doświadczenie ma szereg zalet. W doświadczeniu wykorzystano dwie populacje świń o różnych pulach genetycznych i heterogeniczności (rasę polską zwislouchą oraz krzyżówkę świń zwislouchych i duroc). Pozwoliło to na ocenę możliwości uogólnienia wyników badań. Przed badaniem genetycznym wpływ żywienia zweryfikowano ustalając profil kwasów tłuszczowych dokładną metodą chromatografii gazowej. Badanie RNA-Seq, będące wariantem sekwencjonowania nowej generacji, wykonano na próbie 22 zwierząt, co zapewniło akceptowalną moc doświadczenia i jest osiągnięciem znaczącym zważywszy na koszt tej techniki. Poprawność wyników RNA-Seq uwiarygodniono poprzez zastosowanie metody qRT-PCR dla wybranych genów. W celu sformułowania wniosków uzyskane dane wielowymiarowe dane analizowano nowoczesnymi metodami bioinformatycznymi. Wnioski są naukowo ważne i uzasadnione zebranymi danymi. Doświadczenie przeprowadzono w sposób typowy dla doświadczeń nutrigenomicznych opisywanych w czołowych periodykach w dyscyplinie, zachowując przy tym ich wysoki standard.

Badania przedstawione w pracy doktorskiej są nowatorskie. Nowatorstwo opisanych badań jest dwójakiego rodzaju. Po pierwsze, wynika ono z jego nowoczesnego kierunku, jakim są badania nutrigenomiczne. Po drugie, zastosowana przez Autorkę technika oznaczania aktywności transkrypcyjnej całego genomu należy do najnowocześniejszego standardu współczesnych technik molekularnych. Jednocześnie, badania nie stanowią pierwszego przykładu monitorowania zmian ekspresji genów w wątrobie na skutek zróżnicowanego

dawkowania kwasów tłuszczowych w dawce pokarmowej świń. Tego typu badanie zostało przedstawione przykładowo w pracy Trey'a Kellnera i wsp. w 2017 roku (J. Anim. Sci. 2017.95:3609–3619) jednak bez całościowego ujęcia genomu (praca nie cytowana w rozprawie doktorskiej). Przedstawienie przez Autorkę wyników uzyskanych w populacji o odmiennej puli genetycznej dla całości transkryptów broni oryginalności badań.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a wyniki badań opisanych w rozprawie stanowią istotny postęp naukowy. Autorka dostarczyła wiarygodnych dowodów na wpływ zawartości olejów lnianego i rzepakowego w dawce pokarmowej na profil kwasów tłuszczowych w wątrobie świń. Określiła kierunek zmian i scharakteryzowała różnice między grupami omega-6 i omega-3. Jednocześnie dostarczyła danych częściowo objaśniających mechanizm molekularny stojący u podstaw tego wpływu. Dane o poziomie transkryptów genów wytworzone w toku przeprowadzonego eksperymentu wzbogacają światowe repozytoria i mogą być przedmiotem przyszłych meta analiz.

Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w zootechnice. Wybór tematyki, obiektu i metod badań jest zgodny ze współczesnymi trendami i standardami w reprezentowanej dyscyplinie. Przegląd literatury z zakresu obranej tematyki obejmuje wiele nowych artykułów z czołowych czasopism zootechnicznych. Autorka wystarczająco szeroko omawia współczesną wiedzę z zakresu metabolizmu kwasów tłuszczowych i wyjaśnia istotę nutrigenomiki. Kandydatka wykorzystuje bazy danych, które współcześnie stanowią, obok literatury, ważne źródło wiedzy zootechnicznej. Przykładowo, wykorzystuje sekwencje referencyjną genomu świni oraz jej strukturalny i funkcjonalny opis.

Rozprawa doktorska Agnieszki Szostak świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Szczegółowość opisu zastosowanych metod badawczych, a przede wszystkim techniki RNA-Seq i RT-PCR, świadczy o gruntownym opanowaniu warsztatu naukowego z zakresu transkryptomiki. Zastosowanie nowoczesnych metod analizy wielowymiarowych świadczy o przygotowaniu bioinformatycznym - umiejętności stanowiącej niezbędny element nowoczesnych metod doskonalenia zwierząt. Także, zastosowane metody statystyczne, w tym próba rozwiązania problemu testów wielokrotnych, przemawiają za świadomością naukową Kandydatki.

Rozprawa doktorska, obok wielu zalet, ma również szereg wad, z których najważniejsze warte są indywidualnego omówienia.

Żadna z trzech hipotez nie jest prawidłowa (strony 10-11). Hipoteza pierwsza o wpływie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w dawce pokarmowej na ekspresję genów wynika wprost ze współczesnej wiedzy, jednak jest niejasna z powodu swojej ogólności i złego sformułowania w języku angielskim. Hipoteza druga jest w zasadzie powtórzeniem hipotezy pierwszej, ujętym w jeszcze bardziej rozmyty sposób. Hipoteza trzecia o znaczeniu badań nutrigenomicznych dla poszerzenia wiedzy jest w zasadzie zbędna. W polskiej tradycji, rozprawa doktorska w dyscyplinie zootechnika obejmuje sformułowanie uzasadnionych, ważnych i weryfikowalnych hipotez naukowych. Jednak współczesne badania obejmujące całość genomu, transkryptomu czy metabolomu bardziej odkrywają naturę rzeczy niż weryfikują przypuszczenia o jej stanie. W moim przekonaniu opisane w rozprawie badania są właśnie tego typu, stąd rozprawa nie utraciłaby nic, gdyby hipotez nie sformułowano w ogóle.

Przegląd literatury zaprezentowany na początku nie jest mocnym punktem rozprawy. Przegląd ten ma charakter bardziej podręcznikowy niż naukowy. Wiele z cytowanych prac to prace przeglądowe. Cytowania odnoszą się często do tego, co przywołana publikacja zawiera w swoim wstępie, a nie do ogłoszonych w niej wyników. Ważne prace są pominięte, np. wspomniana już praca Trey'a Kellnera i wsp. w 2017 roku (J. Anim. Sci. 2017.95:3609–3619). Brakuje we wstępie uzasadnienia badań nutrigenomicznych dla doskonalenia świni domowej, czy uzasadnienia własnych badań na tle już opisanej wiedzy. Nie wskazano, które z opublikowanych wyników są mniej wiarogodne, co dałoby pełniejszy obraz aktualnego stanu wiedzy.

Niezrozumiały jest sposób potraktowania problemu testów wielokrotnych. Zróznicowane między grupami doświadczalnymi transkrypty identyfikowano wg kilku kryteriów, w tym p-wartości, skorygowanej p-wartości i wartości kontrolującej akceptowalny udział wyników pozytywnie dodatnich (FDR). Autorka nie wyjaśnia, w jakim celu zastosowano trzy kryteria jednocześnie. O ile w powszechnej opinii nie istnieje prawidłowe rozwiązanie problemu testów wielokrotnych, o tyle zaproponowane przez Autorkę podejścia jeszcze pogłębiło problem.

Forma zaprezentowania wyników przeprowadzonego doświadczenia bliższa jest raportowi technicznemu niż rozprawie doktorskiej. Wyniki różnych porównań między grupami doświadczalnymi przedstawiono identycznie. Przykładowo, cztery długie rozdziały 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4 i 4.2.5 są niezróznicowane w swej formie, powielając nawet układ zdań i fraz. Różnice między rozdziałami ograniczają się do wartości liczbowych i identyfikatorów transkryptów specyficznych dla danego porównania. Takie uproszczone podejście Autorki do formy niepotrzebnie czyni rozprawę nieciekawą w odbiorze, jest nieadekwatne do wartości przedstawianych wyników i nie buduje zaufania do jakości badań.

Dyskusja jest nierówna i w niektórych częściach wydaje się niepełna lub nieprecyzyjna. W pewnych punktach Autorka rezygnuje z zaproponowania interpretacji uzyskanych wyników czy zdefiniowania implikacji. Przykładowo, omawiając różnice w wynikach tego samego doświadczenia przeprowadzonego raz w próbie świń rasy zwisłouchiej i równolegle w próbie świń krzyżówkowych, ogranicza się do stwierdzenia, że niektóre z wpływów żywieniowych na procesy transkrypcyjne genów są specyficzne dla rasy. Brakuje też w dyskusji krytyki wyników własnych. Autorka nie charakteryzuje ograniczeń własnych badań i nie wskazuje jego słabych punktów, np. związanych z wąskim przedziałem wiekowym świń, co jest istotne gdy rozważamy świnię jako model biomedyczny, czy wynikających z niewielkich grup doświadczalnych. W niektórych fragmentach dyskusja jest mało precyzyjna, np. w odniesieniu do wpływu grupy kwasów omega-3 na transkrypcje genów powiązanych z odpowiedzią immunologiczną.

Tabele zawierają liczne powtórzenia. Przykładowo, tabela 5 prezentuje te same informacje co tabela 4. Z kolei niektóre tabele zawierają tak mało informacji, że ujmowanie ich właśnie w formę tabeli jest zbędne (np. tabela 9), zwłaszcza gdy powielają informacje przekazaną w tekście.

Opisy rycin są bardzo krótkie, a czasem niewystarczające. Gdy ryciny stanowią wizualizację wyników badań, czytelnik może oczekiwać informacji, do jakich wniosków prowadzi dany wykres. Autorka jednak tego nie wyjaśnia. Ponadto, ryciny 26-33 (volcano plots i heatmaps) są technicznie złe i w zasadzie nieczytelne.

Spis literatury nie jest uporządkowany alfabetycznie, stąd trudno śledzić, do jakiej publikacji Autorka odnosi swoje stwierdzenia.

Autorka przygotowała rozprawę w języku angielskim, który doskonale nadaje się do opisu badań naukowych z uwagi na swoją precyzję, zwięzłość i bogactwo terminów naukowych. Jednak długość tekstu rozprawy doktorskiej ujawnia to, co pozostałoby ukryte przy krótkiej formie - ubogość frazeologiczną. W połączeniu z niedoskonałościami stylu i błędami gramatycznymi, utrudnia ona zrozumienie niektórych fragmentów rozprawy.

Przyszłe publikacje przygotowane na bazie opisanego w rozprawie doświadczenia zyskają na jakości, jeżeli Kandydatka ustosunkuje się do co najmniej trzech kwestii: Po pierwsze, skąd wynika waga doświadczeń nutrigenomicznych dla produkcji trzody chlewnej i jakie perspektywy niosą obecne lub spodziewane wyniki takich badań? Po drugie, jak powinny być sformułowane hipotezy badawcze? Po trzecie, w jaki sposób podejść do problemu testów wielokrotnych.

Reasumując, przedłożona do oceny rozprawa doktorska Agnieszki Szostak ma formę pracy pisemnej, która jest zgodna z wymogiem ustawowym. Stanowi raport z wartościowych badań przeprowadzonych na podstawowym gatunku zwierzęcia gospodarskiego. Badania te wnoszą oryginalne i nowoczesne rozwiązanie problemu naukowego, którego wybór jest w pełni uzasadniony. Przedłożona rozprawa doktorska w wystarczający sposób prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w zootechnice i świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

W mojej opinii rozprawa doktorska Agnieszki Szostak spełnia wymogi ustalone w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1668 ze zm.), a także wymogi wcześniej obowiązującej ustawy z 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017, poz.1789) i może być podstawą nadania stopnia doktora.



Prof. dr hab. Maciej Szydłowski
UPP w Poznaniu
14 października 2020 r