

Lublin, 21.05.2022 r.

Prof. dr hab. Jolanta Król
Zakład Bezpieczeństwa Żywności i Produktów Regionalnych
Katedra Oceny Jakości i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marzeny Kęsek-Woźniak

pt.: "Wpływ polimorfizmu genów ACACA, DGAT1 i SCD1 na skład i profil kwasów tłuszczowych mleka krów z uwzględnieniem ekspresji genów w gruczole mlekowym"

wykonanej pod kierunkiem

Prof. dr hab. Tadeusza Szulca dr h.c. multi

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Anna Zielak-Steciwko

**w Zakładzie Hodowli Bydła i Produkcji Mleka Instytutu Hodowli Zwierząt
na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu**

Recenzję wykonano na podstawie pisma Pana Przewodniczącego Rady Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
dr hab. Heliodora Wierzbickiego, profesora uczelni z dnia 20.04.2022 r.

Podstawę pracy doktorskiej mgr inż. Marzeny Kęsek-Woźniak stanowią trzy prace opublikowane w latach 2014-2020 oraz nieopublikowane wyniki jednego z doświadczeń (doświadczenie 3). Należy podkreślić, że wszystkie prace wyodrębnione przez Doktorantkę zostały opublikowane w czasopiśmie cieszącym się znaczącym międzynarodowym prestiżem, indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR), tj. jedna w czasopiśmie Animal Science Papers and Reports (IF=0,718, MNiSW=25 pkt), druga w Annals of Animal Science (IF=1,018, MNiSW=20 pkt), a trzecia w czasopiśmie Animals (IF=2,323,

MNiSW=100 pkt). Łączny IF publikacji ujętych w cyklu, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 4,059, a suma punktów według wykazu MNiSW = 145. Według stanu na dzień 21.05.2022 r. prace były cytowane 20 razy.

Wartym podkreślenia jest fakt, że we wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a jej procentowy udział w pracach zawiera się w przedziale 60-70%. Rola Doktorantki we wszystkich trzech wymienionych pracach była wiodąca i pierwszoplanowa. W przypadku pracy przeglądowej (Publikacja 1) Doktorantka dokonała przeglądu i wyboru literatury dotyczącej tematu, tj. czynników genetycznych, fizjologicznych i żywieniowych wpływających na profil kwasów tłuszczowych w mleku krowim oraz opracowała i przygotowała manuskrypt do druku. W ramach dwóch kolejnych prac, wchodzących w skład cyklu (Publikacja 2 i 3) Jej rola polegała na planowaniu badań, pobieraniu materiału badawczego, współuczestnictwie w analizach laboratoryjnych, analizie danych, interpretacji uzyskanych wyników oraz redagowaniu i przygotowaniu manuskryptu do druku. Świadczy to zatem o opanowaniu przez Doktorantkę umiejętności prowadzenia pracy naukowej, w tym prowadzenia analiz i interpretacji uzyskanych wyników, a także ich przedstawiania. Deklaracje Autorki, co do udziału w publikacjach znajdują potwierdzenie w oświadczeniach współautorów. Opracowanie oprócz wykazu przedmiotowych publikacji zawiera wykaz stosowanych skrótów, standardowy układ rozdziałów dla prac naukowych, tj. Wstęp, Hipotezy badawcze i cel pracy, Materiał i metody oraz Omówienie wyników i dyskusję. Opis merytoryczny zakończony jest Podsumowaniem, w którym Autorka sformułowała 7 wniosków. Wydaje się zatem, iż właściwszą nazwą dla tego rozdziału będą „Wnioski”.

Praca doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór trzech prac, w tym dwóch oryginalnych i nieopublikowanych wyników badań, ujętych w tytule „Wpływ polimorfizmu genów ACACA, DGAT1 i SCD1 na skład i profil kwasów tłuszczowych mleka krów z uwzględnieniem ekspresji genów w gruczole mlekowym”. Jednotematyczny cykl badań, opublikowane prace naukowe i nieopublikowane wyniki badań stanowią przemyślaną, komplementarną całość, zawierającą wszystkie badawcze i formalne elementy, merytorycznie związane z przeglądem aktualnego piśmiennictwa, sformulowaniem hipotez badawczych, określeniem celu prac, charakterystyką przyjętych metod badawczych oraz poprawnego przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników, pozwalających na sformułowanie zasadnych wniosków. Zatem należy stwierdzić, że praca doktorska spełnia wszystkie wymagania formalne. Zastanawiające jest jednak dla mnie, dlaczego w tytule pracy Doktorantka nie ujęła

geny kodujące enzym syntazę kwasów tłuszczowych (FASN), który był badany w doświadczeniu 3.

We „Wstępie” Doktorantka przekonująco uzasadnia podjęcie przeprowadzonych badań, wprowadzając czytelnika w tematykę rozprawy. Rozdział ten, jak wskazuje sama Autorka, został opracowany na podstawie Publikacji 1 (praca przeglądowa), wchodzącej w skład cyklu, a co ważne uzupełniony o najnowsze prace z tego zakresu. Pomysł włączenia pracy przeglądowej do rozprawy doktorskiej uważam za jak najbardziej zasadny. Napisanie dobrego artykułu przeglądowego wymaga bowiem od autora bardzo głębokich i intensywnych poszukiwań literaturowych i pozwala dokładnie zapoznać się z tematyką prowadzonych przez niego badań. Doktorantka wskazała, że profil kwasów tłuszczowych zależy od wielu czynników (genetyczne, fizjologiczne, żywieniowe), w tym od polimorfizmu genów. Szczegółowo omówiła genetyczne uwarunkowania syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych, wskazując na związki pomiędzy polimorfizmem genów kodujących kluczowe enzymy biorące udział w tej syntezie (karboksylaza acetylo-CoA – gen ACACA, syntaza kwasów tłuszczowych – gen FASN, desaturaza stearylo-CoA – SCD1, acylotransferaza diglicerydowa – DGAT1) a składem mleka, jak również profilem kwasów tłuszczowych. Interesującym zagadnieniem, opisanym przez Doktorantkę, jest ekspresja genów w gruczole mlekowym. Najnowsze badania wskazują na zróżnicowaną ekspresję genów (głównie ACACA, FASN, SCD) podczas przebiegu laktacji. Wprowadzenie literaturowe uzasadnia zatem w pełni podjęte przez Doktorantkę badania.

Głównym czynnikiem decydującym o składzie kwasów tłuszczowych jest żywienie krów. Prowadzone są liczne badania dotyczące modyfikacji tłuszczu mlekowego w celu zwiększenia udziału kwasów szczególnie korzystnych w kontekście zdrowia człowieka. Autorka we wprowadzeniu również podkreśliła, iż profil kwasów tłuszczowych mleka uwarunkowany jest przede wszystkim żywieniem krów. Bardzo proszę Doktorantkę o rozwinięcie tego tematu podczas obrony.

Głównym celem naukowym badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej Pani mgr inż. Marzeny Kęsek-Woźniak (zamieszczonym w rozdziale Hipotezy badawcze i cel pracy) była analiza wpływu wybranych genomowych czynników na profil kwasów tłuszczowych w kolejnych fazach laktacji. W mojej ocenie zastosowane w celu pracy sformułowanie „wybranych genomowych czynników” jest zbyt ogólne i należałoby je doprecyzować. Chcę zwrócić uwagę, iż w streszczeniu pracy cel badań jest już doprecyzowany „Celem pracy doktorskiej była analiza wpływu wybranych genomowych czynników (polimorfizmu genów ACACA, SCD1 i DGAT1 oraz ekspresji genów ACACA, FASN i SCD) na profil kwasów

tłuszczowych w kolejnych fazach laktacji”. Hipoteza badawcza została sformułowana poprawnie, a szeroki zakres przeprowadzonych badań pozwolił na jej wiarygodną weryfikację.

Rozdział „Materiał i metody” został opisany bardzo dokładnie z podziałem na trzy doświadczenia, a jednocześnie w przypadku doświadczenia 1 i 2 na prezentowane publikacje. Materiał badawczy stanowiły próbki krwi i mleka pobrane od krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej żywionych według systemu TMR. Bardzo proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tego skrótu i scharakteryzowanie systemu.

W ramach wszystkich przeprowadzonych doświadczeń w próbkach mleka oznaczono podstawowy skład chemiczny, liczbę komórek somatycznych i profil kwasów tłuszczowych. W doświadczeniu 1 i 2 z krwi wyizolowano DNA i przeprowadzono analizę polimorfizmu trzech genów: ACACA, SCD1 i DGAT1. W ramach doświadczenia 3 dokonano izolacji całkowitego RNA z wcześniej wyekstrahowanych z mleka komórek somatycznych. Zastosowane metody badawcze zostały właściwie dobrane i szczegółowo opisane. Należy zwrócić uwagę na różnorodność zastosowanych metod i stopień ich zaawansowania, co wymagało od Doktorantki opanowania wielu metod analitycznych i poświęcenia ogromu czasu na przeprowadzenie badań. Jestem pełna uznania za dokonania Doktorantki. Na podkreślenie zasługuje również rozbudowana analiza statystyczna uzyskanych wyników badań.

W kolejnym rozdziale, zatytułowanym „Omówienie wyników i dyskusja”, Doktorantka w sposób syntetyczny omówiła główne wyniki prac eksperymentalnych. W pracy opublikowanej w *Annals of Animal Science* przedstawiono wyniki badań doświadczenia 1, dotyczące zależności pomiędzy kolejną laktacją i polimorfizmem genów ACAC i SCD1 a składem mleka, profilem kwasów tłuszczowych i wydajnością krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Badania wykazały istotny ($p \leq 0,01$) wpływ laktacji na zawartość kwasu C16:1 i CLA, przy czym ilość kwasu C16:1 zwiększała się wraz z kolejną laktacją, w przeciwieństwie do CLA, którego było najwięcej w mleku pierwiastek. Również zawartość kwasu C20:1 była powiązana z kolejną laktacją, istotnie wyższą ($p \leq 0,05$) jego zawartość stwierdzono w mleku od krów będących w I laktacji. Co istotne w analizowanym fragmencie genu ACACA stwierdzono obecność nowego SNP (AJ312201.1g.1488C>G), przy czym nie wykazano istotnych różnic w składzie mleka między genotypami w obrębie tego genu. Stwierdzono natomiast związek polimorfizmu ACACA z zawartością kwasu C13:0 ($p \leq 0,05$), C16:1 ($p \leq 0,01$) i CLA ($p \leq 0,01$). W przypadku genu SCD1, w przeciwieństwie do badań innych autorów, nie zaobserwowano współzależności między SNP A293V a składem mleka i

profilem kwasów tłuszczowych (z wyjątkiem kwasu C14:1). Konieczne jest zatem prowadzenie dalszych badań, aby potwierdzić istniejące związki pomiędzy polimorfizmem genów kodujących enzymy a składem i profilem kwasów tłuszczowych mleka.

Wyniki pracy opublikowanej w czasopiśmie *Animals* są kontynuacją poprzednich badań. Celem pracy było określenie zależności pomiędzy polimorfizmem genów ACACA i SCD1 (analizowanych już w doświadczeniu 1) oraz DGAT1 a profilem kwasów tłuszczowych mleka krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej oraz zmian w profilu kwasów tłuszczowych w kolejnych fazach laktacji w zależności od polimorfizmu wymienionych genów. Badania wykazały wyższe stężenie kwasów tłuszczowych z grupy SFA, które uznawane są za mniej korzystne dla zdrowia człowieka i jednocześnie niższe stężenie kwasów z grupy UFA (korzystne w kontekście zdrowia człowieka) u homozygot: GG w ACACA, VV w SCD1 i KK w DGAT1. Należy podkreślić, iż w analizowanej populacji bydła, genotypy te miały najniższą frekwencję występowania, z kolei najwyższą częstotliwością charakteryzowały się genotypy CC w genie ACACA, AA w SCD1 i AA w DGAT1. Zaobserwowano również istotny związek polimorfizmu analizowanych genów z grupą kwasów tłuszczowych o łańcuchu składającym się z 18 atomów węgla, w przypadku genu DGAT1 były to wyłącznie formy nienasycone. Ponadto wykazano, że faza laktacji wpływała na profil kwasów tłuszczowych w zależności od polimorfizmu wymienionych genów. Wraz z upływem laktacji zanotowano istotny ($p \leq 0,01$) wzrost stężenia kwasów z grupy SFA, przy czym największy wzrost zaobserwowano dla genotypów CC w ACACA (+5,12; $p \leq 0,01$); VA w SCD1 (+4,78; $p \leq 0,01$) oraz AA w DGAT1 (+4,94; $p \leq 0,01$). W przeciwieństwie do form nasyconych stężenie kwasów z grupy MUFA i PUFA zmniejszało się w okresie laktacji, przy czym największy spadek zaobserwowano dla genotypu VV w SCD1 (odpowiednio: -10,04; $p \leq 0,01$ i -0,73; $p \leq 0,01$). Badania wykazały ponadto, iż jedynie gen DGAT1 wpływał na zawartość podstawowych składników mleka, tj., tłuszczu i białka. Genotyp AA był istotnie powiązany z największym spadkiem zawartości tłuszczu, a KK z największym wzrostem zawartości białka w mleku podczas laktacji. Wyniki te mogą przyczynić się do wzbogacenia wiedzy na temat uzyskania korzystniejszego składu mleka. Jak sugeruje Autorka, mogą być one przydatne w przyszłej selekcji bydła mlecznego w celu uzyskania mleka o wyższych walorach prozdrowotnych.

Badania przeprowadzone w ramach doświadczenia 3 (wyniki nieopublikowane) miały na celu określenie zmian w ekspresji genów ACACA, FASN i SCD w kolejnych fazach laktacji, a także analizę interakcji ekspresji wymienionych genów z profilem kwasów tłuszczowych. Do badań ekspresji genów w gruczole mlekowym Doktorantka dokonała

izolacji RNA z komórek somatycznych mleka. Zdaniem wielu badaczy komórki somatyczne mogą być stosowane w badaniach ekspresji genów jako alternatywny materiał wyjściowy, zamiast biopsji gruczołu mlekowego. Uzyskane wyniki (nieopublikowane) wskazują na występowanie zmian w ekspresji genów (ACACA, FASN i SCD) w komórkach somatycznych mleka w trakcie przebiegu laktacji. Istotnie wyższą ekspresję analizowanych genów stwierdzono w trzeciej fazie laktacji w stosunku do pozostałych. W III fazie laktacji uzyskano również wysokie dodatnie współczynniki korelacji ($r=0,929$, $p\leq 0,001$) między ekspresją mRNA dla ACACA i FASN. Analizując interakcje ekspresji wymienionych genów z profilem kwasów tłuszczowych stwierdzono nieliczne słabe korelacje, co zdaniem Doktorantki może wynikać z faktu, że synteza kwasów tłuszczowych w gruczole mlekowym jest procesem bardzo złożonym, regulowanym przez wiele czynników, w tym w szczególności żywienie. Bardzo proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego w omówieniu wyników z doświadczenia 3 nie przedstawiła zmian zawartości kwasów tłuszczowych w okresie laktacji (dane nie pokazane).

Wartość pracy mierzy się głównie konkluzją wyrażoną w formie wniosków końcowych. Oceniana rozprawa zakończona jest 7 trafnie sformułowanymi wnioskami, znajdującymi odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach własnych. Stanowią one pozytywną weryfikację przyjętej hipotezy badawczej. Brakuje mi natomiast wskazania przez Doktorantkę, które z analizowanych genów determinują w największym stopniu zmiany w składzie i profilu kwasów tłuszczowych i jakie są szanse ich wykorzystania w praktyce.

Chciałabym wskazać również na znaczny już dorobek naukowy Kandydatki do stopnia doktora. Obejmuje on, oprócz wspomnianych wcześniej trzech publikacji, współautorstwo w 4 innych artykułach naukowych, które zostały opublikowane również w renomowanych czasopismach międzynarodowych. Ponadto, mgr inż. Marzena Kęsek-Woźniak posiada w swoim dorobku 15 doniesień naukowych, które prezentowała podczas krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych.

Podsumowanie

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam dysertację doktorską mgr inż. Marzeny Kęsek-Woźniak. Szeroki zakres badań wymagał dużego nakładu pracy i umiejętności analitycznych oraz pisania prac naukowych. Oceniana praca jest wartościowym opracowaniem, wnoszącym nowe poznawcze aspekty. O wysokiej wartości naukowej uzyskanych wyników świadczy ich opublikowanie w renomowanych czasopismach o zasięgu

międzynarodowym, co stwarza duże szanse na wielokrotne ich cytowania. Uważam ponadto, że wyniki z doświadczenia 3 mają dużą szansę na publikację w renomowanym czasopiśmie.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Marzeny Kęsek-Woźniak pt. „Wpływ polimorfizmu genów ACACA, DGAT1 i SCD1 na skład i profil kwasów tłuszczowych mleka krów z uwzględnieniem ekspresji genów w gruczole mlekowym” spełnia wymagania stawiane tego rodzaju pracom naukowym określone w art. 13. Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) w związku z art. 179 ust. 1, ust. 3 pkt. 2b Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 ze zm.) i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych dyscyplinie zootechnika i rybactwo. W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Marzeny Kęsek-Woźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


KIEROWNIK
Zakładu Bezpieczeństwa Żywności
i Produktów Regionalnych
Prof. dr hab. Jolanta Król

