

Warszawa, 04.09.2024r.

Prof. dr hab. Beata Kuczyńska
Katedra Hodowli Zwierząt
Instytut Nauk o Zwierzętach
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Pauliny Przybylskiej pt: „Wybrane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs) genu FASN oraz inne czynniki wpływające na skład i zawartość tłuszczu mleka krów”, wykonanej pod kierunkiem naukowym promotora Prof. dr hab. inż. Mariana Kuczaja w Instytucie Hodowli Zwierząt, na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt w Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu.

Podstawę formalno-prawną wykonania recenzji stanowi pismo z dnia 27.08.2024 r. Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Szanownego Pana Dr hab. Heliodora Wierzbickiego, prof. uczelni Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (BDDD000, RNDZiR.410.16.2024) z informacją o powołaniu mnie na recenzenta oraz egzemplarz pracy doktorskiej mgr Pauliny Przybylskiej.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska opracowana przez mgr Paulinę Przybylską pt: „Wybrane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs) genu FASN oraz inne czynniki wpływające na skład i zawartość tłuszczu mleka krów”

opiera się o doskonale powiązany z tytułem cykl czterech oryginalnych publikacji naukowych. Pierwsze dwie posiadają element nowatorski jakim jest określenie wpływu nie poddawanego do tej pory analizie porównawczej SNP-u g.16060A/C genu FASN w porównaniu do czterech pozostałych dobrze znanych z literatury, jednakże jedynie w odniesieniu do składu chemicznego mleka ras krów dominujących w użytkowości mlecznej, szczególnie o

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Nauk o
Zwierzętach

ul. Ciszewskiego 8
02-786 Warszawa
+48 22 59 365 10
inz@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl

niekwestionowanym potencjale genetycznym do wysokiej produkcji rasy krów holsztyńsko-fryzyjskiej.

W dostępnej literaturze nie znaleziono podobnych badań w odniesieniu do ras lokalnych i mniej popularnych. Ostatnie dwie publikacje przyjęte do opublikowania w zeszycie nr 72 na IV kwartał 2024r. w czasopiśmie naukowym *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Seria Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego* odnoszą się do drugiej części tytułu pracy tj. wpływu fazy i numeru laktacji na koncentrację tłuszczu i kompozycję kwasów tłuszczowych w mleku trzech wybranych do eksperymentu ras krów (ZR, RP i RW).

Cykl tych publikacji stanowią następujące prace:

1. Przybylska P., Kuczaj M., 2024a – Relationship between selected SNPs (g.16024A/G, g.16039T/C and g.16060A/C) of the FASN gene and the fat content and fatty acid profile in the milk of three breeds of cows. *Animals*, 14 (13), 1934. <https://doi.org/10.3390/ani14131934>; IF (2023): 2,7; 5-letni IF (2023): 3,0; MEiN: 100 pkt. (2024).

2. Przybylska P., Kuczaj M., 2024b - The effects of two selected single nucleotide polymorphisms of the fatty acid synthase gene on the fat content and fatty acid profile of cow's milk from the Polish Holstein-Friesian Red-and-White breed versus two Polish Red-and-White and Polish Red conservation breeds kept in Poland. *Animals*; 14 (15), 2268. <https://doi.org/10.3390/ani14152268>; IF (2023): 2,7; 5-letni IF (2023): 3,0; MEiN: 100 pkt. (2024).

3. Przybylska P., Kuczaj M., 2024c - Determinants of fat content and fatty acid composition in milk of cows of different breeds. Part 1: Effect of lactation phase. Praca przyjęta do opublikowania (nr manuskryptu: 641-2024; praca zostanie opublikowana w zeszycie nr 72; termin opublikowania: IV kwartał 2024 r.) w czasopiśmie naukowym *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Seria Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego*; MEiN: 40 pkt. (2024).

4. Przybylska P., Kuczaj M., 2024d - Determinants of fat content and fatty acid composition in milk of cows of different breeds. Part 2: Effect of cows' age. Praca przyjęta do opublikowania (nr manuskryptu: 642-2024; praca zostanie opublikowana w zeszycie nr 72; termin opublikowania: IV kwartał 2024 r.) w czasopiśmie naukowym Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis Seria Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego; MEiN: 40 pkt. (2024).

Łączny współczynnik oddziaływania (IF) przedstawionych prac naukowych wynosi 5,4, a łączna liczba punktów wg ministerialnego wykazu czasopism punktowanych (MEiN) wynosi 280 pkt.

We wszystkich publikacjach wchodzących w skład dysertacji Doktorantka jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Indywidualny wkład Doktorantki w przygotowanie poszczególnych prac wg zamieszczonych oświadczeń autorki i współautora Pana prof. dr hab. Mariana Kuczaja był wiodący w trzech pierwszych po 70% w ostatniej czwartej 60%. Wg zamieszczonych oświadczeń Doktorantka uczestniczyła w tworzeniu każdej z prac na różnych etapach jej realizacji m.in. w opracowaniu koncepcji i metodyk badań, nadzorowaniu nad badaniami, analizie i interpretacji danych, pisaniu i redagowaniu manuskryptów oraz korespondencji z redaktorami czasopism. Wyżej wymienione aktywności potwierdzają umiejętności wskazane dla pracowników naukowych. Godne podkreślenia jest fakt, iż Doktorantka wykazała wyjątkową skuteczność, determinację i zaangażowanie w powstawanie prac, które zostały opublikowane lub uzyskały pozytywną zgodę czasopisma do opublikowania w trakcie trwania pierwszego półrocza 2024 roku.

Szczegółowa struktura i ocena rozprawy

Układ pracy jest poprawny i zasługuje na podkreślenie bardzo szczegółowego i logicznego podejścia do jej zaprezentowania. W części opisowo- informacyjnej dysertacji znajduje się 13 rozdziałów. Są to w kolejności: Streszczenie w języku polskim, Abstract w języku angielskim, Wykaz skrótów, Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy, Wstęp (w którym

wyszczególniono podrozdział – Uzasadnienie wyboru tematu), Cel pracy i Hipotezy badawcze, Materiał i Metody, Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy oraz ich znaczenie, Powiązanie tematyczne cyklu publikacji, Omówienie wyników i Dyskusja, Podsumowanie, Wnioski Literatura Kopie publikacji i Dorobek naukowy. Manuskrypt dysertacji został sporządzony na 168 stronach, którą pomimo takiej obszerności czyta się bardzo płynnie i z zainteresowaniem, ponieważ każdy wątek pracy jest ze sobą w logiczny sposób połączony. Taki układ pracy potwierdza głębokie przemyślenia, wysoką dozę skrupulatności, a przede wszystkim satysfakcjonującą dojrzałość naukową Doktorantki.

W rozdziale streszczenie Doktorantka zwraca uwagę czytelnika na charakterystykę genu FASN i związek jego polimorfizmów z gospodarką tłuszczową mleka oraz wpływ dwóch niewątpliwie istotnych czynników poza genetycznych tj. numeru i fazy laktacji krów użytkowanych mlecznie na zawartość całkowitą tłuszczu i kształtowanie profilu kwasów tłuszczowych w mleku.

Uzasadniając wybór tematu pracy doktorskiej Doktorantka uświadamia znaczenie prowadzenia badań genomicznych, w szczególności badania związku konkretnych wariantów genotypowych SNP-ów genu FASN z jakością prozdrowotną mleka.

Doktorantka postawiła 5 celów badawczych i 3 hipotezy z nimi związane, do których odniosła się na końcu pracy w rozdziale Wnioski.

W rozdziale Materiał i Metody, zastosowane metody badawcze i procedury analityczne oraz model analizy statystycznej zostały dobrane właściwie, a ich opis zamieszczony w pracy jest w pełni satysfakcjonujący, co świadczy o samodzielnym przygotowaniu się do doświadczenia i bardzo dobrym opanowaniu warsztatu badawczego. Badaniami objęto 485 krowy reprezentujące trzy rasy (polską czerwono-białą ZR, n=95; polską czerwoną RP, n=148 i polską holsztyńsko-fryzyjską odmiany czerwono-białej RW, n=242) w 17 gospodarstwach, pozyskując od nich mleko w tym samym sezonie żywienia letniego, eliminując prawdopodobnie tym samym oddziaływanie na rezultaty

eksperymentu kolejnych ważnych czynników jakimi są m.in. żywienie i pora roku, czy temperatura. W zebranych materiale biologicznym dokonano izolacji genomowego DNA, a następnie genotypowania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów z uwzględnieniem sekwencji par primerów dla każdego SNP-u, co jest istotnie ważne dla weryfikacji zapisów SNP-ów z danymi literaturowymi, w których jak słusznie Doktorantka zauważyła istnieją czasami rozbieżności w nazewnictwie. W tym celu Doktorantka wykorzystwała uniwersalną ale wysoce specjalistyczną metodę PCR.

W próbkach mleka oznaczono zawartość tłuszczu, a w nim profil 28 kwasów tłuszczowych za pomocą dedykowanych tym celom nowoczesnych metod analitycznych (FTIR i GC). W tej części pracy Autorka zobrazowała w sposób graficzny przykłady amplifikacji badanych prób dla uwzględnionych SNP-ów, co może się okazać bardzo przydatne dla innych badaczy zajmujących się podobną tematyką.

Przy omawianiu poszczególnych publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej zauważa się powtarzalny układ opracowania i podkreślenie przez Doktorantkę wartości aplikacyjnej każdej z nich. Autorka odnosi się nie tylko do cech wykazujących różnice statystycznie istotnie, ale także do tych najbardziej pożądaných zdrowotnie, które nie były istotne, a były uwzględnione w analizie statystycznej.

Wszystkie wyniki zostały dodatkowo w sposób czytelny w języku polskim zebrane w postaci rankingu w 6 tabelach w rozdziale Podsumowanie, pomimo tego, że były opublikowane w publikacjach w języku angielskim. Ta klasyfikacja pozwoliła w sposób klarowny wskazać, jak duży jest wpływ zmienności genetycznej na jakość mleka pod względem gospodarki tłuszczowej.

Wszystkie zacytowane pozycje literatury zostały dobrane tematycznie, są prawidłowo cytowane a ich łączna liczba to 250 (95 – w autoreferacie, 40 – w 1. publikacji; 50 – w 2. publikacji; 31- w 3. publikacji; 34- w 4. publikacji). Analizując dane bibliometryczne niespełna 25% pozycji z całości powtarza się w cyklu publikacji stanowiących rozprawę. Jest to literatura zarówno polsko, jak i anglojęzyczna datowana od

najstarszej z 1957 roku (metoda referencyjna ekstrakcji tłuszczu wg Folcha) do 2024 r., z przewagą publikacji z ostatniej dekady, co potwierdza umiejętność korzystania przez Doktorantkę ze światowych zasobów specjalistycznego piśmiennictwa naukowego.

Imponujący jest także przedstawiony dorobek naukowy Doktorantki w postaci 4 oryginalnych publikacji i 26 doniesień naukowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Uwagi i pytania do Doktorantki

W tej części mojej recenzji chciałabym podzielić się uwagami i pytaniami, które nasunęły mi się w czasie opiniowania pracy i nie są zarzutami, ale mogą stanowić podstawę do dyskusji w czasie obrony, a być może inspirację do dalszych badań naukowych:

1. W materiałach i metodyce brak podania informacji według jakiej metody prowadzono ekstrakcję tłuszczu z mleka a może wykorzystano transmetylację kwasów tłuszczowych bezpośrednio z mleka? W publikacji numer 1 jest zawarta informacja o ekstrakcji wg opisu Folcha. Jeśli taka metoda była zastosowana to dlaczego?, przecież referencyjna dla ekstrakcji mleka jest wg Rosego-Gotlieba. Czy Doktorantka mogłaby wytłumaczyć jaka jest różnica zastosowania do ekstrakcji tłuszczu z materiału biologicznego między tymi dwoma metodami?
2. W zamieszczonym w dysertacji doktorskiej w sformułowaniu celu numer 2, Doktorantka wskazuje na określenie frekwencji poszczególnych wariantów genotypów pięciu badanych SNP-ów genu FASN, jednakże we wnioskach nie znalazłam informacji na ten temat. Informacja ta znajduje się w publikacji nr 1 w tabeli 2. dlatego też proszę o uzupełnienie wniosku w części informacyjno-opisowej pracy tzw. autoreferatu, ze względu na uzyskanie spójności

odniesienia się do celów pracy we wnioskach oraz wartości poznawczej tej informacji.

3. Wniosek końcowy wskazujący, że najlepsze jakościowo mleko z punktu widzenia profilu lipidowego pochodzi od krów rasy rodzimej polskiej czerwono-białej (ZR) z dwóch pierwszych laktacji powinien moim zdaniem być o uzupełniony np. o podkreślenie najwyższej koncentracji pożądanego w diecie prekursora dla rodziny kwasów omega-3, czyli kwasu alfa-linolenowego C18:3 n3 i uwzględnienia związku między jego koncentracją w tłuszczu mlekowym a frekwencją SNP-u typu 2, czyli g16024 AA.
4. Czy Doktorantka zastanawiała się dlaczego jest tak duże zróżnicowanie zmienności genetycznej u badanych ras rodzimych krów pod względem analizowanych SNP-ów genu FASN.
5. Czy zdaniem Doktorantki zasadne są badania genomowe w selekcji bydła użytkowanego mlecznie, jeśli tak - to w odniesieniu do jakich parametrów oceny użyteczności mlecznej?

Praca jest napisana bardzo dobrym stylem. Zauważyłam jedynie bardzo drobne nieścisłości w postaci braku rozwinięć niektórych skrótów pojawiających się w tekście po raz pierwszy a nie uwzględnionych w wykazie (np. bp.) lub zamiany terminów specjalistycznych wynikających prawdopodobnie z zaciągnięcia z tłumaczeń angielskich (np. ekson vs. egzon), które nie wpływają w żaden sposób na obniżenie wartości rozprawy, ale należałoby je uwzględnić w celu poprawności i ujednolicenia tekstu.



Podsumowanie i wniosek końcowy

Pracę doktorską Pani mgr Pauliny Przybylskiej pt. „Wybrane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs) genu FASN oraz inne czynniki wpływające na skład i zawartość tłuszczu mleka krów” oceniam pozytywnie i bardzo wysoko. Doktorantka właściwie sformułowała i zweryfikowała 3 hipotezy badawcze, zrealizowała cele badań i uzyskała wyniki o istotnej wartości merytorycznej oraz niekwestionowanej wartości aplikacyjnej w odniesieniu do badań genomicznych nie tylko w naszym kraju ale także o zasięgu międzynarodowym, o czym świadczą opublikowane wyniki pracy w renomowanym czasopiśmie *Animals* nr 14 w dwóch artykułach, po pozytywnym zweryfikowaniu przez anonimowych recenzentów. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej istotnie poszerzają wiedzę na temat wykorzystania selekcji genomowej dla produkcji mleka o jakości prozdrowotnej i wpisują się w rozwój dyscypliny zootechniki i rybactwo.

Wyrażam opinię, że przedstawiono do oceny praca doktorska Pani mgr Pauliny Przybylskiej pt. „Wybrane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs) genu FASN oraz inne czynniki wpływające na skład i zawartość tłuszczu mleka krów”, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w związku z art. 179 ust.1 oraz ust. 3 pkt 2 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2028 poz. 1669 ze zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Przybylskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Ze względu na wartość poznawczą i aplikacyjną wyników pracy szczególnie w odniesieniu do jakości prozdrowotnej mleka krów ras lokalnych, będących w programach ochrony zasobów genetycznych i uzyskaniu wysokiego wpływu oddziaływania (IF) na rozwój dyscypliny zootechniki i rybactwo o łącznej wartości 5,4 w ciągu zaledwie jednego roku kalendarzowego wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Pauliny Przybylskiej pt. „Wybrane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNPs) genu FASN oraz inne czynniki wpływające na skład i zawartość tłuszczu mleka krów”. Chciałabym także podkreślić, że samodzielne wykonanie analiz na tak dużej liczbie krów (485 sztuk) wymagało od Doktorantki bardzo kompleksowego przygotowania logistycznego eksperymentu i opanowania warsztatu analitycznego, czego dowodzi fakt, że jest współautorką prac oryginalnych składających się na rozprawę doktorską jedynie z promotorem pracy Panem prof. dr hab. Marianem Kuczajem.

Z poważaniem

B. Kuczyńska