



Olsztyn, dn. 23-06-2023 r.

### **Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Mateusza Sachajko**

#### **Dietary effect of polyunsaturated fatty acids on the porcine liver by analyzing the differential gene expression and weighted gene co-expression network analysis of miRNA data in Polish Landrace and Polish Landrace x Duroc pigs**

Wpływ wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w diecie na wątrobę świń poprzez analizę zróżnicowanej ekspresji genów oraz analizę sieci ważonej koekspresji genów danych miRNA u świń rasy polskiej białej zwislouchej i krzyżówki polskiej białej zwislouchej z duroc

*Recenzję wykonano na zlecenie Dziekana Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernia w Toruniu z dnia 25 kwietnia 2023*

### **Tematyka Pracy**

Obserwowany w ostatnich latach postęp w badaniach naukowych wskazuje na konieczność interdyscyplinarnego podejścia do analizowanych zagadnień. Na przełomie XX i XXI w. nastąpił znaczący rozwój dyscyplin łączących nauki o żywności i żywieniu z biologią molekularną tj. nutrigenetyki oraz nutrigenomiki. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) zdrowie to stan pełnego dobrostanu fizycznego, psychicznego i społecznego, a nie tylko brak choroby czy kalectwa. Oznacza to, że w kwestiach zdrowia nie należy koncentrować się na chorobach i próbach ich zwalczania, ale raczej skupiać na profilaktyce np. stosując odpowiednie żywienie [m.in. Trujillo i in. 2006]. Trend ten znajduje również odzwierciedlenie w hodowli zwierząt gospodarskich. Zdrowotność stada utrzymywana na wysokim poziomie pozwala na wykorzystanie potencjału genetycznego zwierząt, a w konsekwencji na osiągnięcie zysku ekonomicznego [Straw i in. 2006; Fairbrother 2012]. Prawidłowe żywienie warunkuje pełne wykorzystanie potencjalnych, genetycznie uwarunkowanych możliwości optymalnego rozwoju fizycznego zwierząt, a jednocześnie zapewnia zachowanie homeostazy ustrojowej. Celem prowadzonych badań nutrigenomicznych jest analiza różnic w regulacji ekspresji genów przez poszczególne składniki diety. Pozwala to zrozumieć, jak odżywianie wpływa na ogólną homeostazę organizmu i jego zdrowie [Lao-Villadonig i in. 2009]. Identyfikuje ponadto zależność przemian metabolicznych organizmu od dostarczonych składników pokarmowych [Chadwick 2004]. Wykazano, że określone składniki paszy np. kwas foliowy, metionina, cholina, betaina czy też selen wpływały na zmianę umaszczenia potomstwa myszy, zmniejszając również poziom otyłości, cukrzycy i nowotworów [Koziołkiewicz 2009], modyfikowały także poziom aktywności transkrypcyjnej poprzez regulację stopnia metylacji DNA [Fenech 2009]. Skutkami zaburzeń tego procesu są hiper- lub hipometylacja. Poza dietą na poziom metylacji DNA mają wpływ również czynniki środowiskowe. Właściwa podaż składników do organizmu pozwala na odpowiednią regulację procesów metabolicznych już na poziomie molekularnym. Składniki pokarmowe oraz substancje bioaktywne dostarczane do

organizmu mogą podlegać różnym przemianom metabolicznym w zależności od występującego polimorfizmu. Niezależnie natomiast od sposobu metabolizmu składniki te mogą działać na dwóch płaszczyznach procesu ekspresji genów. Wpływają na represję lub aktywację procesu transkrypcji poprzez regulację struktury chromatyny lub też jako czynniki transkrypcyjne, regulujące bezpośrednio aktywność receptorów jądrowych oraz w sposób pośredni poziom transkrypcji genów kontrolowanych przez receptory [Pieszka i Pietras 2010].

Jedną z substancji o udowodnionym wpływie na organizm są kwasy tłuszczowe. Jak podają Deckelbaum i in. [2006] te aktywne biologicznie czynne związki spełniają w organizmie szereg funkcji: biorą udział w acylacji i sortowaniu białek, aktywacji enzymów, receptorów błonowych, tworzeniu odpowiedzi immunologicznej a także wzroście, różnicowaniu i proliferacji komórek. Wolne kwasy tłuszczowe poza pełnieniem funkcji sygnałowych regulują aktywność czynników transkrypcyjnych oraz mają zdolność hamowania lub aktywacji ekspresji pewnych genów. Zwłaszcza długołańcuchowe kwasy tłuszczowe z rodziny n-3 PUFA (EPA oraz DHA) pośrednio wpływają na poziom ekspresji genów związanych z metabolizmem energii, glukozy oraz lipidów [Jump 2004]. Ponadto, jak dowodzą wyniki badań [Weyman i Schneider 2008] istnieje wiele czynników transkrypcyjnych regulowanych działaniem kwasów tłuszczowych. Wpływają one m.in. na poziom ekspresji genu lipazy lipoproteinowej oraz apolipoproteiny. Ponadto, PUFA n-3 odgrywają dużą rolę w przebiegu procesu zapalnego, wywierając wpływ na ekspresję genów odpowiedzialnych za jego powstawanie.

Procesy związane z metabolizmem kwasów tłuszczowych zachodzą w różnych komórkach organizmu, można jednakże wyróżnić trzy najbardziej istotne miejsca gdzie metabolizm tłuszcz zachodzi najintensywniej, takie jak wątroba, tkanka tłuszczowa i mięśnie szkieletowe.

Przy rozważaniach tego typu trudno nie wspomnieć o świniach jak jednym z ciekawszych gatunków zwierząt gospodarskich, uważanych za model do badań naukowych dotyczących ludzi - co wynika z ich anatomicznego i fizjologicznego podobieństwa do człowieka. W ciągu ostatnich lat przeprowadzono wiele badań asocjacyjnych całego genomu różnych gatunków w tym świni, próbując odkryć genetyczne uwarunkowanie zróżnicowania profilu kwasów tłuszczowych. Jednakże droga od statystycznego powiązania strony strukturalnej genomu poprzez jego funkcjonalną charakterystykę, do identyfikacji kluczowych, przyczynowych wariantów genetycznych wciąż wymaga prowadzenie kompleksowych badań angażujących różne tzw. technologie "omiczne" i w ten trend wpisuje się oceniana dysertacja

### **Podstawa formalna recenzji**

Przedstawiona do oceny praca doktorska jest zwięzłą i obszerną monografią w języku angielskim, która zawiera 217 stron, z podziałem typowym dla rozprawy doktorskiej właściwie opisującym tematykę prowadzonych badań tj: wprowadzenie, cel, materiał i metody (23 strony), opis najważniejszych wyników uzyskanych w trakcie badań (143 strony), dyskusja (15 stron), bibliografia 206 pozycji literaturowych a także streszczenie wyników w języku polskim i angielskim (2 strony). W pracy zamieszczono 79 rysunków oraz 64 tabele. Szkoda, że ze względu na bardzo małą czcionkę część wykresów jest mało czytelna, zaś opisy tabel mocno lakoniczne i mało precyzyjne. Praca została przygotowana na ogół starannie, w sposób wyczerpujący opisane zostały zagadnienia metodyczne - tym niemniej można znaleźć pewne drobne niedociągnięcia natury językowej oraz organizacyjnej tekstu. Zdarzają się powtórzenia treści przy opisywaniu wyników, co moim zdaniem nie jest konieczne, a może być pewnym utrudnieniem dla czytelnika w odbiorze wyników.

## **Ogólna charakterystyka rozprawy, problem naukowy, jego sformułowanie i aktualność podjętego zagadnienia naukowego**

Podjęte przez Doktoranta badania bez wątpienia mają charakter nowatorski zarówno od strony tematyki jak i zastosowanej metodologii, tak w ujęciu krajowym jaki w odniesieniu do obecnie znanych i opublikowanych badań na świecie. Na uznanie zasługuje nie tylko zastosowana metodologia odnosząca się do wykorzystania technologii wielkoskalowych analiz gnomicznych, ale też nowatorskie podejście do opracowywania wyników od strony bioinformatycznej. Jest to pierwsza tego typu praca wykonana w Polsce, która obejmuje swym zakresem szeroka analizę ekspresji miRNA wątroby świni przy jednoczesnym ujęciu nutrigenomicznym, starającym się określić sposób wpływu poziomu i jakości kwasów tłuszczowych w diecie na zmiany aktywności genów w wątrobie u świni. Wartość pracy ma na pewno nie tylko aspekt poznawczy jako badań podstawowych, ale też wytycza drogę do dalszych eksperymentów z użyciem świni jako zwierzęcia modelowego w celu lepszego zrozumienia ewentualnych zaburzeń metabolicznych u ludzi. W tym kontekście skupienie uwagi Doktoranta na badaniach mikroRNA można uznać za właściwą i swego rodzaju kluczową drogę do poznania procesów regulacyjnych decydujących o aktywności genów związanych z metabolizmem wątroby, bowiem mikroRNA (miRNA) są znanym i ważnym elementem epigenetycznej regulacji ekspresji genów. Niekodujące regulatorowe mikro RNA o długości około 22 nukleotydów odgrywają istotną rolę w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów poprzez ich wiązanie z docelowym regionem nieulegającym translacji 3' (UTR) mRNA, regionem kodującym lub końcem 5' regionu niekodującego. Mikro RNA biorą udział w regulacji głównych procesów biologicznych, począwszy od proliferacji komórek, różnicowania, po apoptozę, oraz procesy rozwoju i zachowania właściwych funkcji różnych narządów organizmu zwierząt. Są też wskazywane jak potencjalne biomarkery pomocne w identyfikacji patogenezы zaburzeń metabolicznych wywołanych przez różne czynniki środowiskowe, w tym czynniki związane z niewłaściwym poziomem składników bioaktywnych w pożywieniu, jak też mogą być indykatorami charakteryzującymi odpowiedź organizmu na infekcje, w tym obronę przeciwwirusową.

Badania wielkoskalowe przedstawione przez Doktoranta mają tą zaletę, że obejmują swym zakresem weryfikację oddziaływania wszystkich aktywnych genów określając ich interakcję na poziomie całego genomu. Jednakże ze względu na generowanie dużej ilości obszernych zbiorów danych wymagają też zastosowania bardzo zaawansowanych metod bioinformatycznych, co stanowi zawsze duże wyzwanie dla właściwego opracowywania wyników oraz wyciągania ostatecznych wniosków. Doktorant podejmując to wyzwanie zastosował kompleksową analizę sieci korelacji ważonej (WGCNA), która pozwoliła mu na identyfikację koekspresji genów, w odniesieniu do baz danych GO i KEGG oraz bardziej szczegółowej analizy ontologii i szlaków metabolicznych. Można przyznać że Doktorant z powodzeniem przeprowadził kompleksowe analizy bioinformatyczne co jest też dowodem na posiadanie przez niego szerokiej i aktualnej wiedzy oraz odpowiednich umiejętności w stosowaniu narzędzi bioinformatycznych popartych właściwą interpretacją uzyskiwanych wyników.

### **Cel rozprawy**

Celem przedstawionej pracy doktorskiej była charakterystyka profilu ekspresji genów mikroRNA u mieszańców PL i PLxDuroc w kontekście nutrigenomicznym, uwzględniającym wpływ zróżnicowanego stosunku/ zawartości dodatku kwasów omega 6/3 . Narzędziem do tego było oparcie się na zaawansowanych metodach bioinformatycznych do analizy danych

miRNA-seq. W rozprawie Doktorant przeprowadził trzy etapowe kompleksowe analizy bioinformatyczne, a mianowicie 1) analizę DEG 2) pakiet WGCNA R do analizy koekspresji 3) ClueGO do analizy szlaków.

Tak zestawiona kilkuetapowa analiza miała za zadanie ocenę wpływu kwasów tłuszczowych omega-6 i omega-3 na profil "transkryptomu mikro RNA w wątrobie świń, oraz charakterystyka interakcji w ekspresji genów w wątrobie, określenie jej zależności od genotypu świń oraz jej wpływu na szlaki metaboliczne.

Doktorant zakładał w pracy tezę, że dieta wzbogacona w PUFA ma znaczący wpływ na ekspresję genów wątrobowych co ma bezpośredni wpływ na zdrowie i dobrostan zwierząt i ludzi. Teza ta choć prawidłowa nie wynika z przedmiotowych badań ale z analizy literatury i na podstawie przeprowadzonych analiz nie jest realnie możliwa do udowodnienia. Hipotetycznie można założyć po kompleksowej analizie szlaków metabolicznych, że udział mikro RNA w regulacji ekspresji wskazanych genów może mieć pozytywne bądź negatywne znaczenie dla zdrowia organizmu. Jednak to stwierdzenie pozostaje sugestią opartą o analizy przeszukujące bazy bioinformatyczne i nie może być udowodnione w niniejszej pracy. Dlatego sugeruję korektę tak sformułowanej hipotezy w trakcie przygotowywania pracy do druku. Kolejnym ważnym elementem wymienianym przez Doktoranta jest modelowy uniwersalny charakter eksperymentu żywieniowego. Należy rozumieć, że celem pracy było wykazanie że pełny profil ekspresji genów w wątrobie świń może wyjaśnić szereg specyficznych mechanizmów fizjologicznych, biochemicznych i metabolicznych, co jest trudne do realizacji bezpośrednio w badaniach dotyczących organizmu człowieka. Natomiast świnia jest doskonałym modelem zwierzęcym i takie badania mogą przyczynić się do wyjaśnienia wpływu diety wzbogaconej w kwasy nienasycone na zdrowie człowieka.

Po drugie, hipoteza zakładała, że dzięki przeprowadzeniu dobrze zaprojektowanego eksperymentu żywieniowego pełny profil ekspresji genów w wątrobie może wyjaśnić szereg specyficznych mechanizmów fizjologicznych, biochemicznych i metabolicznych. Po trzecie, świnia jest doskonałym modelem zwierzęcym do wyjaśnienia wpływu diety PUFA na zdrowie człowieka. Jest to słuszne założenie aczkolwiek dla większego uprawdopodobnienia stawianej tezy wskazane byłoby przeprowadzenie analiz porównawczych odnośnie transkryptomu wątroby mikro RNA świni i mikro RNA człowieka. Przedstawione cele i tezy są słuszne ale dla lepszego odbioru przez czytelnika wymagają pewnej korekty.

### **Ocena znajomości literatury dotyczącej problematyki badań**

Szeroko bogato udokumentowana literatura zawierająca 207 pozycji literaturowych, oraz sposób jej doboru wskazuje na dogłębną znajomość podjętego tematu, Cytowane pozycje piśmiennictwa ujęte w pracy są zgodne z problemem badawczym podjętym w niniejszej rozprawie.

### **Poprawności i oryginalnie metodyczna oraz zakres rozwiązania zagadnienia naukowego**

Prezentowana praca podejmuje oryginalny temat, dotyczący epigenetycznej regulacji ekspresji genów, który jest aktualny i wpisuje się w intensywnie rozwijający się nurt badań nutrigenomicznych. Zakres przeprowadzonych analiz jest adekwatny do założonych hipotez badawczych. Prezentowane badania, metody i uzyskane wyniki zostały omówione skrupulatnie, uwzględniając aktualne dane literaturowe z przedmiotowego obszaru wiedzy.

Materiałem wykorzystanym w prezentowanej rozprawie były próbki wątroby pobranej od świń rasy polskiej białej zwisłouchej oraz mieszańców polskiej białej zwisłouchej z rasą duroc. Pożądanym byłoby jednak dokładniejszy opis dotyczący sposobu pozyskania materiału, oraz charakterystyki materiału zwierzęcego. Doktorant powołuje się na pracę opisującą

eksperyment żywieniowy w publikacji, tym niemniej uważam, że skrócony opis powinien jednak zawierać takie informacje jak płeć, wiek, masę ciała oraz kryterium wyboru osobników spośród większej grupy zwierząt, które uczestniczyły w eksperymencie żywieniowym. Należy natomiast zauważyć, że Doktorant bardzo szczegółowo przedstawił metodykę analiz molekularnych oraz analiz bioinformatycznych. Tym niemniej zabrakło mi informacji dotyczącej jakości uzyskiwanych ekstraktów RNA, co jest niewątpliwie ważnym elementem dla oceny dokładności i wiarygodności tego typu analiz. Brakuje też wyjaśnienia istoty celu porównań między osobnikami różnych ras, które były żywione różnym rodzajem paszy pod względem suplementacji nienasyconymi kwasami omega 6 i omega 3. Czy to porównanie miało istotne znaczenie czy Doktorantowi chodziło o wskazanie interakcji czynników środowiskowych i genetycznych?

### **Przydatność uzyskanych wyników w praktyce**

Doktorant przedstawił obszernie uzyskane wyniki obejmujące analizy DEG, WGCNA jaki i mapowania genów mi RNA, oraz liczne zestawienia tabelaryczne. Na uwagę zasługuje też szczegółowa oprawa graficzna, diagramy Venna sieci interakcji oraz mapy cieplne, obrazujące ekspresję genów miRNA. Szczególnie interesujące są wyniki analiz WGCNA, które dostarczają cennych informacji wynikających z korelacji zidentyfikowanych modułów z cechami fenotypowymi. Dla dogłębnej interpretacji niemniej cennym uzupełnieniem są z pewnością analizy sieci "Pathway analysis" opracowywane przy użyciu Platformy Cytoscape - ClueGo, które wizualizują sieci powiązań między genami w zależności od stopnia wysycenia szlaków procesów biologicznych. Niestety niektóre wykresy są bardzo gęsto „utkane” i w mojej ocenie utrudnia to właściwą ich interpretację. Takie wykresy powinny być w powiększonej formie załączone w postaci suplementu przy przygotowywaniu pracy do druku.

Rozdział dyskusja jest opisany w sposób prawidłowy odnosząc uzyskane wyniki do aktualnych danych literaturowych. Zabrakło mi odniesienia do wyników uzyskanych z analiz sieci interakcji z zastosowaniem programu Cytoscape - ClueGo, które zostały przedstawione w formie tabelarycznej i oraz graficznej. Odniesienie się do tych wyników pozwoliłoby lepiej wyjaśnić charakter oddziaływania mikro RNA w odniesieniu do interakcji genów w obrębie szlaków metabolicznych procesów biologicznych ścieżek sygnałowych itp.

W podsumowaniu pracy Doktorant przedstawia 7 wniosków, pierwszy jest w zasadzie wynikiem, pozostałe wnioski są poprawne, choć piąty wniosek w przedstawionej formie jest w mojej ocenie zbyt ogólny i wymagałby doprecyzowania. W powiązaniu z brakującymi elementami dyskusji, które wskazałem wcześniej udałoby się Doktorantowi taki bardziej precyzyjny wniosek przedstawić.

### **Uwagi polemiczne i dyskusyjne**

Całość pracy oceniam wysoko pod względem metodycznym nowatorskim i jakościowym, tym niemniej oprócz kilku uwag przedstawionych wcześniej, pojawiają się jeszcze dodatkowe pytania. Czy na bazie zebranego materiału podejmowano próby weryfikowania zmiany ekspresji genów docelowych dla zidentyfikowanych mikro RNA. Taka analiza na pewno byłaby pożądana, dla dogłębnej weryfikacji stawianych hipotez, zwłaszcza, że umożliwiłaby, bezpośrednie odniesienie mikro RNA do mRNA, a tym samym oparcie się na realnej ekspresji genów.

Czy Doktorant w swoich analizach przeprowadzał weryfikację pod kątem zmian sekwencji nukleotydów rozpoznawanych przez wytypowane mikro RNA w odniesieniu do grup rasowych. Biorąc pod uwagę udział kwasów omega 6 i omega 3 w indukcji i modulowaniu

procesów zapalnych, interesujące jest pytanie czy spośród zidentyfikowanych miRNA można wskazać takie które mogą uczestniczyć w modulacji tych procesów. Jest to o tyle ważne, że wskazanie czy też wyróżnienie takich mikro RNA jako biomarkerów niekorzystnych procesów mogłoby być przedmiotem do dalszych badań o charakterze aplikacyjnym również w medycynie weterynaryjnej i ludzkiej.

### **Ocena końcowa**

Pan mgr Mateusz Sachajko wykazał się dużą wiedzą w dyscyplinie nauki biologiczne, o czym świadczą wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej. Doktorant zrealizował wszystkie cele, zastosowane metody dowodzą dobrego opanowania przez Niego trudnego warsztatu badawczego, a uzyskane wyniki wnoszą szereg nowych informacji dotyczących transkryptomu mikro RNA świń rasy polskiej białej zwiślouchej i krzyżówki rasy polskiej białej zwiślouchej x Duroc. Wyniki są oryginalne, a praca ma wyraźny aspekt aplikacyjny. Zamieszczone w recenzji uwagi nie umniejszają wartości przedstawionej do oceny rozprawy.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska wykonana przez Pan mgr Mateusza Sachajko, spełnia w mojej opinii warunki stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne przez obowiązujące przepisy określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021r., poz. 478 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

### ***Literatura:***

- Chadwick, Proceedings of the Nutrition Society, 63,161-166, 2004  
Trujillo et al., Journal of the American Dietetic Association 106 (3), 403-413, 2006  
Straw et al., Diseases of swine. 9th edition, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 2006  
Fairbrother et al., Diseases of Swine, WileyBlackwell, 723-749, 2012  
Pieszka i Pietras, Rocz. Nauk. Zoot., 37, 2, 83-103, 2010  
Deckelbaum et al., Am. J. Clin. Nutr., 83, 1520-1525, 2006  
Fenech et al., J.Nutrigenet. Nutrigenomics, 4(2), 69-89, 2011  
Jump, Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 41, 4278, 2004  
Koziołkiewicz, Biotechnologia 4 (87) 9-34 2009  
Lao-Villadónig et al., Journal of Spanish Society of Anti-Aging Medicine and Longevity. SEMAL 13, 8-11, 2009  
Michaud and Renier, Diabetes, 50, 660-666, 2001  
Weymann and Schneiter, Nature, 9, 162-179, 2008