

Dr hab. Katarzyna Piórkowska, prof. IZ  
Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt  
Instytut Zootechniki PIB  
Sarego 2, 31-047 Kraków

Kraków, 19.06.2023

Recenzja  
Rozprawy doktorskiej Pana mgr Mateusza Sachajko  
W formie monografii pod tytułem:

„Dietary effect of polyunsaturated fatty acids on the porcine liver by analysing 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”

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (*PolyUnsaturated Fatty Acid*, PUFA) to grupa lipidów niezbędnych dla wszystkich organizmów. Powszechnie uznaje się, że kwasy te mają duże znaczenie żywieniowe i fizjologiczne, są niezbędne do utrzymania homeostazy w organizmach zwierzęcych, a także w profilaktyce przewlekłych chorób zwyrodnieniowych u ludzi. Posiadają one właściwości przeciwzakrzepowe, przeciwzapalne, zapobiegania arytmii czy łagodzenia chorób autoimmunologicznych jak reumatoidalne zapalenie stawów. Niestety, ze względu na brak enzymów odpowiedzialnych za endogenną syntezę kwasów tłuszczowych omega-6 i omega-3 (n-6 i n-3) przez ssaki, następuje konieczność ich stałego przyjmowania w diecie, dlatego też określa się je jako niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT). Obecnie, dieta Europejczyków jest uboga w kwasy PUFA, szczególnie dotyczy to kwasu omega-3, ponieważ stosunek omega-6/omega-3 w diecie wynosi przeważnie 15-20:1, gdzie optymalne wartości np. jako ochrona przed patologiami zwyrodnieniowymi powinny wynosić 1:1. Naturalnym źródłem omega-3 są tłuste ryby morskie, jednak ich spożycie w wielu częściach świata jest bardzo niskie. Alternatywą dla spożywania ryb jest manipulowanie składem mięsa w kierunku bardziej korzystnego stosunku n-6/n-3. Wielu autorów uważa, że u zwierząt jednożołądkowych jak np. świnie, profile kwasów tłuszczowych w tkankach ściśle odzwierciedlają profile kwasów tłuszczowych ich diety. Dlatego też, optymalizowanie diety zwierząt poprzez dodawanie źródeł tłuszczu o korzystnym stosunku PUFA n-6/n-3 mogą prowadzić do istotnych zmian w składzie produktów pochodzenia zwierzęcego.

Obecnie wieprzowina jest drugim najczęściej spożywanym mięsem na świecie i dlatego wzbogacenie jej w kwasy szczególnie PUFA n-3 miałyby wymiennie korzystny wpływ na dietę człowieka. Aktualnie poszukiwane są różne źródła tego kwasu, które mogłyby stanowić dodatek paszowy w diecie trzody chlewnej, wpływając na dobre walory wieprzowiny pod

względem stosunku PUFA n-6/n-3 i jednocześnie nie zmieniając walorów smakowych mięsa. Niestety, olej lub mączka rybna, które są bezpośrednim źródłem kwasów eikozapentaenowy (EPA) i kwas dokozaheksaenowy (DHA), dodawane do diety świń wyraźnie wpływają na tzw. rybi posmak wieprzowiny. Z kolei, według innych autorów bogate w omega-3 siemię lniane (w postaci kwasu alfa-liponowego ALA) dodawane do paszy świń krótko przed ubojem powoduje włączenie tego kwasu głównie do podskórnej tkanki tłuszczowej – słoniny, a nie do tłuszczu śródmięśniowego IMF, który jest integralną częścią mięsa i determinantem jego smaku.

Od innej strony patrząc, świnie poza potencjalnym źródłem produktów wzbogaconych w kwasy omega-3, stanowią doskonały zwierzęcy model badawczy do badań oceniających wpływ kwasów PUFA na parametry korelujące z ryzykiem wystąpienia przewlekłych chorób zwyrodnieniowych u ludzi, ponieważ procesy zachodzące w organizmie świni znacznie lepiej odzwierciedlają procesy fizjologiczne obserwowane u człowieka w porównaniu z modelem opartym o małe zwierzęta laboratoryjne.

Obecnie wiele badań koncentruje się na pomiarze ogólnoustrojowych zmian ekspresji genów w odpowiedzi na związki dodawane do diety na różnych poziomach molekularnych, w celu poznania ścieżek metabolicznych i wielokierunkowych mechanizmów ich działania. Pomimo, szerokiej wiedzy w zakresie potencjalnych skutków działania kwasów omega-6 i omega-3, nadal nie do końca rozstrzygnięte jest jaki wpływ na transkryptom różnych tkanek wywołuje dieta wzbogacona w kwasy PUFA, szczególnie w zakresie analizy niekodujących cząsteczek RNA regulujących ekspresję genów.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej Pana mgr-a Mateusza Sachajko

### *Oryginalność badań*

Rozprawa Pana mgr-a Mateusza Sachajko przygotowana została w języku angielskim, z dołączonym streszczeniem w języku polskim. Przedstawiona rozprawa doktorska w formie niepublikowanej monografii naukowej liczy 217 stron i posiada typowy układ dla tego typu opracowań.

Tematyka z zakresu oceny procesów molekularnych w odpowiedzi na dodatki paszowe, szczególnie wpływające na poprawę jakości i składu mięsa wieprzowego, co łączyło by się z właściwościami prozdrowotnymi tego produktu i wpływało na dietę człowieka, jest przedmiotem wielu badań i wciąż jest aktualna. W literaturze można znaleźć wiele najnowszych opracowań, w których poszukiwano optymalnych rozwiązań z zakresu dodatków paszowych zawierających odpowiednie ilości i proporcje kwasów n-6/n-3, dodatkowo, które nie zmieniałyby walorów smakowych wieprzowiny.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej analizie poddano cząsteczki miRNA, które ulegają ekspresji w wątrobie w zależności od diety wzbogaconej w wielonienasycone kwasy tłuszczowe, lecz bez zmiany proporcji tych kwasów. Podjęte badania są nowatorskie, ponieważ w literaturze dotychczas brak opracowań z tego zakresu. Z kolei, cząsteczki miRNA należące do rodziny niekodującego RNA, stanowią bardzo interesujący przedmiot badań, ponieważ ich możliwości nie do końca zostały jeszcze ustalone, choć pierwotnie sądzono, że są one odpowiedzialne wyłącznie za degradację cząsteczek mRNA, poprzez wiązanie z regionami 3'UTR. Badania niedokujących RNA w kontekście regulacji procesów związanych z

odkładaniem się tkanki tłuszczowej i otyłością u człowieka, w dobie wpisania otyłości na listę chorób cywilizacyjnych i zaliczenia polskich dzieci do grupy jednych z najszybciej tyjących w Europie, wydają się być niezwykle istotne. Dlatego też, podjęta przez doktoranta tematyka dotycząca oceny wpływu diety stosowanej u świni domowej zawierającej zwiększoną zawartość PUFA na ekspresję miRNA wyrażanych w wątrobie wpisuje się w obszar badań podstawowych z zakresu nauk biologicznych, a także w nurt nowoczesnych badań nutrienomicznych, co może w przyszłości zostać wykorzystane przy opracowywaniu zoptymalizowanego żywienia świń. Ponadto, przeprowadzone badania i uzyskane wyniki stanowią źródło informacji także dla biologii człowieka, potwierdzając, że świnia domowa może być dobrym modelem w badaniach nad otyłością oraz rozpoznawaniem molekularnych procesów związanych z odkładaniem się tkanki tłuszczowej.

W przedstawionej pracy doktorskiej zostały zastosowane nowoczesne metody z zakresu biologii molekularnej (ocena globalnego poziomu ekspresji genów związanych z cząsteczkami miRNA) oraz bio-informatyki (analiza różnicowej ekspresji genów z wykorzystaniem narzędzia Deseq2, a także analiza sieci ważonej ko-ekspresji genów, *weighted gene co-expression network analysis*, *WGCNA*) w celu identyfikacji kluczowych cząsteczek miRNA wyrażanych w wątrobie zależnych od podwyższonej zawartości PUFA w diecie oraz genów docelowych, aby wskazać mechanizmy molekularne istotne dla metabolizmu lipidów, w tym wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Dysertacja nie do końca jednak została przygotowana w sposób staranny, przejrzysty i spójny, co zostało wskazane w dalszej części recenzji, gdzie zostały omówione kolejne rozdziały. Ponadto, w mojej opinii, praca wymaga lektorskiej korekty, znalazłam w teście wiele błędów, w tym gramatycznych i stylistycznych, skrótów myślowych, czy zgubionych wyrazów. W dalszej części oceny merytorycznej, oceny kolejnych rozdziałów wskazane zostały głównie uwagi, które należy uwzględnić przy przygotowaniu pracy jako publikację.

### *Wprowadzenie i cele badawcze*

Wprowadzenie liczy 8 stron i złożone jest ze wstępu, wypunktowanych hipotez badawczych, oraz krótkiego przeglądu literatury. W mojej opinii, w samym wstępie, jak również w przeglądzie literatury zabrakło informacji na temat optymalnej zawartości kwasów n-6/n-3 w odniesieniu do dodatku paszowego, a później do spożywanego mięsa wieprzowego, w celu poprawy jego właściwości prozdrowotnych jako elementu diety człowieka. Dodatkowo, zabrakło informacji na temat ewentualnych zagrożeń związanych z nieodpowiednimi proporcjami tych kwasów w pożywieniu jak np. patologie układu krążenia, choroby autoimmunologiczne, rozwój nowotworu czy nadmierne wydzielanie czynników prozapalnych.

W odniesieniu do przedstawionych hipotez badawczych, pierwsza i trzecia hipoteza badawcza posiadają błąd, ponieważ w ramach obecnej rozprawy doktorskiej analizie poddane zostały wyłącznie cząsteczki miRNA, które ulegają ekspresji w wątrobie, a nie cały transkryptom (nie było to jak zostało określone *comprehensive transcriptome investigations*, pomimo kolejno przeprowadzonej analizy dotyczącej identyfikacji genów docelowych dla zidentyfikowanych cząsteczek miRNA, gdyż była to w tym wypadku jedynie predykcja). Część dotycząca przeglądu literatury liczy tylko 5 stron jest wyjątkowo krótka i niestety niewyczerpująca, mogłaby ona zostać wzbogacona o kilka rozdziałów np. dotyczących ras świń

K.P.

wykorzystanych w obecnym badaniu, gdzie polska biała zwisłoucha (PBZ) wykorzystywana jest jako komponent matczynej, a duroc jako ojcowski do krzyżowań. Ponadto te dwie rasy różnią się istotnie choćby pod względem poziomu tłuszczu śródmięśniowego, który jest istotny w tym kontekście.

Informacje dotyczące roli miRNA w wątrobie powinny stanowić osobny podrozdział, który następowałby po podrozdziale 1.2.6 dotyczącym ogólnych informacji o cząsteczkach miRNA. W podrozdziale 1.2.6. dotyczącym cząsteczek miRNA brak informacji na temat ich funkcji w regulacji ekspresji genów. Dodatkowo w przeglądzie literatury można byłoby dodać podrozdział dotyczący samej analizy miRNA oraz sieci ważonej ko-ekspresji genów, i przykłady na jej zastosowanie, ponieważ analiza ta stanowi główną część przedstawionej dysertacji. Dodatkowo w tym rozdziale w wielu miejscach brak odnośników literaturowych (cytowanych pozycji).

Cele badawcze, zostały mało precyzyjnie sformułowane, np. przy analizie WGCNA zostało wskazane, że będzie ona dotyczyła *whole hepatic transcriptome*, czyli całego transkryptomu wątroby, a obecne badanie dotyczy tylko analizy miRNA oraz przewidywania genów docelowych dla tych cząsteczek. Dodatkowo w wielu punktach zamiast genów miRNA o różnicowej ekspresji, wskazano geny o różnicowej ekspresji (*differentially expressed genes*, DEGs), które to określenie dotyczy genów o różnicowej ekspresji w kontekście całego transkryptomu. Niestety błąd ten pojawia się w różnych rozdziałach przedstawionej dysertacji. Uważam, że stosowanie go w kontekście genów miRNA o różnicowej ekspresji jest niepoprawne i powinno zostać zastąpione DE miRNAs czyli *differentially expressed miRNAs*. Ponadto, informacje wskazane w punktach dotyczą raczej części metodycznej, a nie celów badawczych. Niemniej jednak, wskazane uwagi należy uwzględnić przy przygotowaniu pracy do druku.

### *Material i metody*

Rozdział ten liczy 12 stron. W paragrafie dotyczącym żywienia zwierząt, brak informacji jakie zostały zastosowane proporcje kwasów n-6/n-3 w dodatku paszowym. Z podanych wartości dotyczących zawartości kwasów LA i ALA można je wyliczyć, jednak te informacje powinny zostać podane w tekście. Ponadto, nie jest jasne, co oznacza próg/linia odcięcia dla proporcji n-6/n-3 na poziomie poniżej 7 dla grupy kontrolnej oraz powyżej 7 dla grupy testowej, gdzie w obecnym badaniu proporcja tych kwasów wynosiła około 10:1.

Rycina 1, która powinna przedstawiać schemat aktualnego doświadczenia, przedstawia doświadczenie z pracy doktorskiej Pani dr Szostak, i choć doktorant cytuje tą pracę, doświadczenie dr Szostak obejmowało znacznie więcej osobników oraz grup badawczych w porównaniu z obecnym eksperymentem, co wprowadza czytelnika w błąd.

W części dotyczącej przygotowania bibliotek do sekwencjonowania w technologii następnej generacji (NGS) – wskazano, że przygotowano bibliotek cDNA (co odnosi się do całego transkryptomu), jest to błąd ponieważ przygotowano w tym wypadku biblioteki jedynie dla genów miRNA. Ta sama uwaga dotyczy Ryciny 2. i kilku kolejnych podrozdziałów.

W części dotyczącej izolacji bibliotek miRNA z wykorzystaniem selekcji na urządzeniu Pippin Prep, zostało wskazane, że prócz produktów o długości około 150 bp, które odnoszą się do przygotowanych bibliotek miRNA, izolowano również inne fragmenty dotyczące

K.P.

niezwiązanych z adapterami cząsteczek miRNA, piwiRNA oraz sRNA. Bardzo proszę o wyjaśnienie jaki to miało cel.

W sekcji dotyczącej sekwencjonowania z wykorzystaniem urządzenia MiSeq NGS, nie jest jasne dlaczego w nawiasach zostały podane dwie wartości zarówno w miejscu dotyczącym rozcieńczenia bibliotek jak i kontroli PhiX. Ponadto, brak informacji, czy wszystkie badane próbki były sekwencjonowane w ramach jednej analizy, oraz czy sekwencjonowanie było w wersji w jedną (*single-*) czy w dwie strony (*pair-end*), a także o zastosowanej ilości cykli. Z Tabeli 1 można wywnioskować część z tych informacji, jednak powinno to zostać podane także w tekście.

Rozdział dotyczący przetwarzania surowych danych uzyskanych po sekwencjonowaniu miRNA, w mojej opinii, powinien stanowić część wyników, a nie część metodyczną. Niemnie jednak, analiza jakości uzyskanych odczytów została nie do końca przeprowadzona poprawnie lub jej opis jest niewyczerpujący (mało jasny), ponieważ na podstawie samej oceny jakościowej surowych sekwencji z wykorzystaniem oprogramowania FastQC nie jesteśmy w stanie przeprowadzić oceny jakości (QC), która powinna zostać przeprowadzona dopiero po odcięciu adapterów oraz błędnych odczytów (ciągi sekwencji N) czyli po tzw. *trimming* u z wykorzystaniem takiego oprogramowania jak flexbar czy fastp. Na stronie 31 doktorant wskazał, że uzyskane odczyty były wyłącznie dobrej jakości, dlatego pominięto etap *trimmingu*, nie jest jasne w tym kontekście czego dotyczył *trimming* czy analizy QC czy innego rodzaju filtracji np. po długości odczytów. Nie ma także informacji do jakiej wersji genomu referencyjnego oraz wersji bazy danych zostały zmapowane uzyskane odczyty, co jest dość istotne w ujęciu adnotacji zidentyfikowanych DE miRNA. Ponadto, jeśli korzystano z bazy danych mirBase to skąd numery identyfikacyjne przy zidentyfikowanych miRNA z bazy Ensemble (wersji genomu 10.2), proszę wyjaśnić. Te wszystkie nieścisłości powinny zostać wyjaśnione i uzupełnione przed przygotowaniem publikacji.

W analizie WGCNA wykorzystana została macierz dla miRNA w ilości 535 cząsteczek miRNA, nie mniej jednak nie ma informacji skąd taka macierz została pobrana, lub z jakiej puli wyselekcjonowana.

W podrozdziale 3.3.7., zostały wskazane 4 grupy badawcze, w tym dwie grupy rasowe (czystorasowa i mieszańce) oraz dwie grupy żywieniowe (kontrola i grupa eksperymentalna, dla której podwyższono zawartość kwasów LA i ALA w racjach żywieniowych). Kolejno, porównywano profile miRNA pomiędzy poszczególnymi grupami i tu kolejne pytanie: dlaczego porównywana była grupa mieszańców karmiona standardową/kontrolną dietą z grupą czystorasową na diecie eksperymentalnej o podwyższonej zawartości kwasów PUFA (i analogicznie odwrotny przypadek)? W związku z tym, że przy tych porównaniu mamy dwa czynniki, nie do końca wiadomo z czym związane były zidentyfikowane DE miRNA. W analizie różnicowej ekspresji z wykorzystaniem narzędzia Deseq2 jest możliwość uwzględnienia dwóch zmiennych w modelu, jednak w rozdziale metodyka nie ma informacji czy i w jaki sposób wprowadzono te informacje do analizy, należy to uzupełnić. Ponadto w analizie Deseq2 nie wskazano, jakie dane wykorzystano do analizy czy w formie *raw count*, TPM, RPKM czy FPKM, co należy wyjaśnić.

Ponadto, przy przygotowaniu pracy jako publikację należało by dodać rozdział dotyczący walidacji wyników sekwencjonowania miRNA w technologii NGS, którą można wykonać z wykorzystaniem techniki qPCR, co potwierdziło by wiarygodność uzyskanych

wyników. Dodatkowo, ponieważ tylko część zidentyfikowanych w analizie Deseq2 DE miRNA uwzględniono dalej w analizie WGCNA, po której wykonano kolejno analizę funkcjonalną, może dla pozostałych miRNA także należałoby przeprowadzić analizę wskazania genów docelowych i dla nich analizę funkcjonalną co wzbogaciłoby uzyskane wyniki i dalej rozdział dyskusji.

W podrozdziale dotyczącym analizy WGCNA i przewidywania kolejno genów docelowych dla ważnych cząsteczek miRNA ulegających ko-ekspresji, nie jest jasne co oznacza wartość 90, informacja ta powinna zostać uzupełniona. Ponadto, przy analizie WGCNA brak informacji czy zastosowano jakiś model statystyczny uwzględniający efekty stałe oraz zmienne, z racji uwzględnienia zwierząt o różnej rasie i na różnej diecie? W rozdziale wyniki doktorant wspomina tylko, że te dane (o rasie i diecie) zostały zestawione z danymi dotyczącymi cech fenotypowych, aby znaleźć korelację pomiędzy cechami a dietą/rasą/grupą eksperymentalną. Ponadto, dlaczego w analizie funkcjonalnej zastosowano referencję dla człowieka, czy nie było możliwości zastosowania referencji dla świni?

W mojej opinii rozdział Materiał i Metody został opisany bardzo ogólnie, ponieważ brakuje wielu szczegółów, które wyjaśniłyby istniejące nieścisłości czy niedopowiedzenia. Dlatego też rozdział ten wymaga doprecyzowania i poszerzenia według wskazówek zawartych powyżej, co należy uwzględnić przy przygotowaniu publikacji.

## Wyniki

Wyniki zostały zaprezentowane na 142 stronach, w postaci 63 Tabel oraz 77 Rycin.

W całej sekcji Wyniki, doktorant wskazuje, że dieta eksperymentalna była dietą PUFA, co jest skrótem myślowym, ponieważ kwasy wielonienasycone w formie ALA i LA stanowiły dodatek paszowy także w diecie kontrolnej tylko w zmniejszonej ilości, dlatego też w tym wypadku należałoby wskazać dietę eksperymentalną jako dietę wzbogaconą w PUFA, np. „*PUFA enriched diet*” czyli w skrócie *PE diet*.

W części metodycznej doktorant wskazał, że przeprowadził analizę jakości i ilości przygotowanych bibliotek miRNA i podał wartości RIN, warto było by jednak w tym miejscu (w rozdziale Wyniki) dołączyć choć jedno zdjęcie/wynik jednej analizy, po rozdziale elektroforetycznym na urządzeniu Agilent, które wskazywałoby, że przygotowane biblioteki mają faktycznie odpowiednią długość, co należy uzupełnić przy przygotowaniu pracy do druku.

Pierwsza część zaprezentowanych wyników dotyczy analizy różnicowej ekspresji czyli wskazującej geny kodujące miRNA w zależności od wykonanych porównań pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi. Dobrym zobrazowaniem na początek byłoby przedstawienie wykresu typu „*heatmap*”, która prezentowałaby skupienie poszczególnych próbek w obrębie grup badanych w zależności od poziomu ekspresji w tym przypadku ekspresji genów miRNA (może oczywiście prezentować brak zależności), co należy uzupełnić przy przygotowaniu pracy do publikacji. Doktorant nie uniknął także w wielu miejscach błędu, jakoby w obecnym badaniu był analizowany cały transkryptom i często występuje pojęcie DEGs, zamiast „DE miRNAs” lub profili miRNA dla tkanki wątrobowej. W podrozdziale 4.1.1. doktorant zidentyfikował 1256 wspólnych miRNA dla grupy I i II, nie ma jednak informacji, czy te miRNA zostały dalej uwzględnione w ocenie różnicowej ekspresji genów miRNA, co powinno zostać uzupełnione, także w kolejnych rozdziałach prezentujących wykresy typu

Venn. Ponadto w części metodycznej nie ma informacji na temat narzędzia/strony internetowej jakiego użył doktorant do wygenerowania diagramów typu Venn. Wyniki z Tabeli 3, nie zostały jasno zaprezentowane. Po pierwsze w nagłówku jest błąd odnośnie grupy badanej, powinno być *enriched PUFA diet PL x D* jest *PUFA diet PL*. Ponadto jako poprawkę na wielokrotne testowanie zastosowano FDR (*false discovery rate*), co było wspomniane w części metodycznej, dlatego w nagłówku warto byłoby zastąpić „*adjusted pvalue*” na „FDR”. Jeśli chodzi o zaprezentowanie wyników miRNA to w Tabeli 3, w pierwszej kolumnie zostały przedstawione numery identyfikacyjne z bazy Ensemble dla transkryptów (wersja genomu *Sus scrofa* 10.2), nie mamy jednak ani w części metodycznej, ani w wynikach informacji, w jaki sposób przypisano uzyskane wyniki sekwencjonowania do numerów identyfikacyjnych dla transkryptów z bazy Ensemble wersji genomu 10.2 *Sscrofa*. Ponadto, aktualne badanie miało na celu identyfikację genów (o różnicowej ekspresji) dla cząsteczek miRNA, a nie gospodarzy (tzw. hostów dla miRNA). Dlatego też, w rekordach gdzie wskazano cząsteczki lncRNA, i nie znamy dokładnej nazwy zidentyfikowanego miRNA, w kolumnie nazwa genu (miRNA) powinno zostać wskazane „nowe miRNA”. Ponadto, z Tabeli 3 nie zostały usunięte hiperłącza (kolor niebieski i podkreślenie). Dodatkowo, do tej Tabeli dobrze było by dodać także wartości  $\log_2FC$  (*fold change*) jako dopełnienie. W kolejnym podrozdziale, gdzie wskazano geny o różnicowej ekspresji kodujące miRNA, charakteryzujące się wartościami  $FC > 2$  prawdopodobnie zaistniało niedopowiedzenie, ponieważ w części metodycznej zostało wskazane, że wyniki będą prezentowane w formie parametru  $\log_2FC$  i nie ma informacji, że wartości  $\log_2FC$  były transformowane do wartości FC. Ponadto, w części metodycznej zostało wskazane, że wyniki które były nieistotne po poprawce na wielokrotne testowanie (FDR), zostaną usunięte, jednak w rozdziale Wyniki zaprezentowane zostały również takie nieistotne wyniki, ale posiadające wysokie wartości  $FC > 3$  i  $> 5$ . W związku z tym w rozdziale metodyka taka informacja powinna zostać uzupełniona, gdzie należy zaznaczyć możliwość rozpatrywania wyników nieistotnych po poprawce, ale z wysokimi wartościami  $\log_2FC$ . W Tabeli 4 powinny zostać uwzględnione także informacje o wartości *p value* przed poprawką i po poprawce statystycznej, nawet jeśli te wartości były nieistotne statystycznie. Opis Tabeli 4 jest błędny jak w przypadku Tabeli 3 i nie usunięto w nim hiperłącza. W kolejnych Tabelach od 5-21 uwagi tak jak wyżej. Podrozdział 4.1.3 porównanie grup mieszańców na diecie kontrolnej do grupy PBZ na diecie eksperymentalnej, jak wcześniej wspomniałam bardzo proszę o wyjaśnienie o czym miałyby świadczyć uzyskane wyniki gdy obserwujemy tu dwie zmienne (rasę i dietę). Ponadto, w podrozdziale tym wskazano, że uwzględniono wyniki dla wartości *p value*  $< 0.01$  i  $0.05$ , co należałoby wyjaśnić i uzupełnić w części metodycznej. W podrozdziale 4.1.4 podobnie jak wyżej porównywanie grup: świnię PBZ na diecie kontrolnej z mieszańcami na diecie wzbogaconej w PUFA - wymaga wyjaśnienia. W wynikach, jak wspomniałam w metodyce, powinien zostać dodany rozdział dotyczący walidacji wyników miRNA-seq oraz ewentualnie poszukiwanie genów docelowych i analiza funkcjonalna dla miRNA nieuwzględnionych dalej w analizie WGCNA.

W analizie WGCNA, brakuje informacji skąd zaczerpnięto macierz dla miRNA w liczbie 535, co wspomniano przy okazji części metodycznej. Podrozdziały od 4.2.3.1. – 4.2.3.5 oraz Tabela 23 dotyczą opisu badanych cech, co powinno stanowić podrozdział w części metodycznej. W części Wyniki dotyczącej analizy WGCNA brakuje tabeli dotyczącej rozkładu badanych cech fenotypowych wraz z podstawowymi statystykami jak średnia czy wartości

min/max na tle grupy badawczej jak i populacji. W rozdziale tym doktorant wspomina, że informacje o rasie, grupie eksperymentalnej czy diecie zostały zestawione z danymi dotyczącymi cech fenotypowych, aby znaleźć pomiędzy nimi korelację. Nie do końca jest jasne czy wynik tej korelacji został zaprezentowany na Rycinie 10, gdzie poziom cechy odniesiono do każdej z badanych prób, ponieważ na stronie 84 opis przedstawionego wykresu sugeruje, że dotyczy on czegoś innego, należy to wyjaśnić. Ponadto, na tej rycinie nie jest jasne, co oznacza nasycenie barw na prezentowanym wykresie. Czy kolor biały przy konkretnym osobniku oznacza, że nie było danych względem tej cechy, jak dla próbki 21R odnośnie zawartości kwasów tłuszczowych? Czy próbka 21R została wykluczona z dalszej analizy? Doktorant nie uniknął również błędów w nazewnictwie próbek przy kolejnych prezentowanych wykresach typu *heatmap*: próbka 21R oraz 30r2 powinny przynależeć do rasy PBZ, a nie mieszańców. W związku z zaistnieniem tych pomyłek, w tekście przy opisie wyników, także występują błędy. Podrozdziały 4.2.5 i 4.2.6 prezentują parametry jakie uwzględniono w analizie WGCNA, co powinno zostać przeniesione do części metodycznej. Ponadto, prezentowane wykresy typu *heatmap* wskazujące na zależność pomiędzy poziomem ekspresji/ko-ekspresji genów dla cząsteczek miRNA w obrębie każdego z wyznaczonych modułów nie kładą badanych próbek w obrębie grup badawczych: rasowych czy żywieniowych, co wskazuje, że zmienne te nie miały związku z wyznaczonymi modułami i ko-ekspresją genów miRNA w wątrobie, co trzeba by było zaznaczyć w opisie wyników. Od Ryciny 14 występuje błąd, ponieważ Rycina ta w tekście cytowana jest jako 13. Kolejno, przedstawiono Ryciny od 19-26, które nie zostały nigdzie opisane i skomentowane. Od Ryciny 27 występuje błąd w tekście, ponieważ jest ona cytowana jako Rycina 26 i dalej do końca rozdziału Wyniki błąd ten jest powtarzany. Podrozdział 4.2.8, zatytułowany identyfikacja miRNA związanych z cechami pod wpływem diety PUFA (jak wcześniej wskazałam powinno być diety wzbogaconej w PUFA). Przy omawianiu wyników dotyczących parametru  $a^*$ , określającego nasycenie mięsa barwą czerwoną doktorant używa nazewnictwa raz  $a^*$ , a raz określenia *A asteriks*, co wprowadza lekkie zamieszanie, powinno to zostać zunifikowane. W nazewnictwie Rycin od 27-52 powinno zostać wskazane *vs. miRNA gene significance* zamiast *gene significance*.

Podrozdział 4.3 dotyczy powiązania istotnych miRNA z genami docelowymi oraz analizy funkcjonalnej wykonanej dla genów docelowych. Doktorant wspominał, przy analizie z wykorzystaniem narzędzia miRDB, że dostępne są adnotowane genomy referencyjne dla człowieka, myszy, szczura, psa i kury, nie wspominał jednak z jakiej referencji korzystał, taka informacja powinna zostać umieszczona w rozdziale metodyka. Tabele 51 i 52 zostały omówione w tekście, ale nie zostały zacytowane. Tabele od 53-61 nie zostały omówione w tekście, ani zacytowane. W kolejnym podrozdziale 4.4 doktorant prezentuje procesy biologiczne oraz ścieżki metaboliczne i sygnałowe, w które zaangażowane są geny wskazane jako docelowe dla cząsteczek miRNA ulegających ko-ekspresji wg wskazanych modułów. Wyniki tej części zostały dobrze przedstawione w postaci wykresów prezentujących zidentyfikowane szlaki w zależności od ilości genów docelowych (dla miRNA), od procentowego udziału poszczególnych szlaków w obrębie każdego modułu oraz w postaci sieci powiązań pomiędzy poszczególnymi szlakami/ procesami biologicznymi.

Rozdział wyniki wymaga jednak gruntownej korekty i uporządkowania przed przygotowaniem pracy jako publikacji.



## Dyskusja

Rozdział ten został przedstawiony na 16 stronach i zawiera dwie Tabele.

W części dyskusji dotyczącej analizy różnicowej ekspresji genów dla miRNA doktorant omawia kolejno cząsteczki miRNA najważniejsze wg jego oceny, które zidentyfikowano jako cząsteczki charakteryzujące się różnicową ekspresją genów w zależności od badanej grupy żywieniowej czy rasy, sugerując, że cząsteczki te stanowią nowe źródło biomarkerów związanych z dietą wzbogaconą w wielonienasycone kwasy tłuszczowe i omawia je w oparciu o dostępną literaturę weryfikując wcześniej postawione hipotezy. Tabela nr 63 dotycząca wskazania cząsteczek miRNA, których geny ulegały różnicowej ekspresji, i które zidentyfikowano dla kilku wykonanych porównań pomiędzy grupami, według mojej opinii powinna zostać przedstawiona w rozdziale Wyniki.

Część druga dotycząca omówienia analizy WGCNA czyli analizy ko-ekspresji genów kodujących cząsteczki miRNA, które zostały zebrane w panele/moduły ze względu na ich ko-ekspresję w wątrobie. Kolejno moduły te zostały zestawione z cechami fenotypowymi świń jak poziom tkanki tłuszczowej, koncentracja kwasów PUFA, MUFA, czy SFA w wątrobie czy inne cechy dotyczące jakości mięsa wieprzowego. Przedstawione wyniki zostały uznane za istotne jeśli poziom ekspresji z danego modułu korelował istotnie z poziomem cechy. Na stronie 187 dyskusji zostało wskazane, że zidentyfikowano 9, 7, 2 i 8 cech fenotypowych, które powiązane zostały z konkretnymi modułami/panelami miRNA (ulegającymi wspólnej ekspresji) zależne od diety PUFA, jednak w rozdziele wyniki, nie wskazano istotnej zależności pomiędzy grupą, rasą czy wprowadzoną dietą, a którymkolwiek z modułów, gdyż prezentowane wykresy typu *heatmap* nie wskazywały na tworzenie wyraźnych grup w zależności od rasy czy diety. Stąd też w części dyskusji należałoby wskazać, że ko-ekspresja cząsteczek miRNA w wątrobie wydawała się nie być zależna od wprowadzonej diety czy grupy rasowej. W tej części doktorant identyfikując kluczowe miRNA ulegające wspólnej ekspresji w wątrobie, których ekspresja została skorelowana z poziom badanej cechy fenotypowej, wskazuje jako nowe markery wątrobowe warunkujące te cechy fenotypowe. W dalszej części dyskusji została przedstawiona Tabela zestawiająca kluczowe miRNA z pozycjami literaturowymi, w których były one omówione w różnym kontekście. Tę część dyskusji podzielono na podrozdziały w których omówiono centralne/kluczowe miRNA (tzw. *hub* miRNA) dla każdego ze zidentyfikowanych modułów ekspresyjnych w kontekście dostępnych pozycji literaturowych. Doktorant wskazuje zaangażowanie kluczowych miRNA w determinowanie poziomu podskórnej tkanki tłuszczowej, oksydację kwasów tłuszczowych czy wykorzystanie glukozy poprzez szlaki PPAR czy MAPK. Niemniej jednak, w mojej opinii część tą można by było rozwinąć i przedyskutować w kontekście metabolizmu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Ponadto brakuje choć jednego paragrafu komentarza, czy wykorzystanie analizy WGCNA w przypadku identyfikacji kluczowych cząsteczek miRNA zależnych od diety wzbogaconej w PUFA przyniosło oczekiwane efekty. Ponadto w tym rozdziale można byłoby przedyskutować temat dodatków paszowymi, poszukiwanie najkorzystniejszego źródła PUFA, ponieważ w literaturze można znaleźć wiele wątpliwości w odniesieniu do stosowania dodatków zawierających kwas ALA. Z jednej strony, sugeruje się, że kwas ten wbudowuje się w tkankę tłuszczową głównie podskórną, co nie przedkłada się na właściwości samego mięsa, a dodatkowo ALA utrudnia syntezę DHA, ponieważ przyczynia się do konwersji DHA w EPA.

K.P.

Dyskusja stanowi wg mojej opinii najmocniejszą część pracy, choć zyskałaby lepszą formę, gdyby komentarz do uzyskanych w przedstawionej dysertacji wyników, bezpośrednio odnosił do informacji zawartych w literaturze.

### *Wnioski*

Dysertacja została zakończona rozdziałem wniosków, jednak rozdział ten powinien brzmieć podsumowanie i wnioski, ponieważ część wymienionych punktów stanowi podsumowanie, a nie wyciągnięte w oparciu o przeprowadzone badania wnioski.

### *Cytowana literatura*

Dysertacja została przygotowana w oparciu o 206 pozycji literaturowych, jednak nie najnowszych ponieważ tylko 25% stanowiło pozycje literaturowe wydane w okresie ostatnich 5 latach.

Podsumowując recenzję, pomimo licznych uwag, które w mojej opinii wynikają z braku uporządkowania prezentowanego materiału, które nie umniejszają wniesionych wartości merytorycznych i poznawczych z zakresu informacji o cząsteczkach miRNA ulegających ekspresji w wątrobie, także w kontekście wprowadzenia podwyższonej zawartości kwasów wielonienasyconych do diety, stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska wpisuje się w obszar dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinę nauk biologicznych i spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 roku poz. 574).

Katarzyna  
Piórkowska