



UNIWERSYTET ROLNICZY

im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Ośrodek Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej

Dr hab. inż. Artur Gurgul, prof. URK
Ośrodek Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
ul. Rędzina 1C, 30-248 Kraków

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Alicji Wierzbickiej
pt.: „*Analiza czynników modulujących efekty suplementacji witaminą D: perspektywa literaturowa, badania transkryptomyczne i epigenomiczne*”

Ogólna charakterystyka pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki PIB, pod opieką naukową dr hab. Marii Oczkowicz, prof. IZ oraz promotora pomocniczego dr inż. Anny Koseniuk. Rozprawę doktorską stanowią cztery opublikowane artykuły naukowe, w tym jedna praca przeglądowa oraz trzy oryginalne prace naukowe. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w czasopismach z listy Journal Citation Reports, których łączny wskaźnik IF (zgodnie z rokiem publikacji) wynosi 19,1 a Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 450 pkt (wykaz MNiSW 2023).

Artykuły wchodzące w skład dysertacji:

1. Wierzbicka A, Oczkowicz M. Sex differences in vitamin D metabolism, serum levels and action. *Br J Nutr.* 2022 Dec 14;128(11):2115-2130. doi: 10.1017/S0007114522000149. Epub 2022 Jan 19. PMID: 35042577.
IF=3,6; pkt MNiSW=100
2. Wierzbicka A, Świątkiewicz M, Tyra M, Szmatoła T, Oczkowicz M. Effect of different doses of cholecalciferol and calcidiol on meat quality parameters and skeletal muscle transcriptome profiles in swine. *Meat Sci.* 2023 Mar;197:109071. doi: 10.1016/j.meatsci.2022.109071.
IF=7.1; pkt MNiSW=140

3. Wierzbicka A, Pawlina-Tyszko K, Świątkiewicz M, Szmatoła T, Oczkowicz M. Changes in miRNA expression in the lungs of pigs supplemented with different levels and forms of vitamin D. *Mol Biol Rep.* 2023 Dec 12;51(1):8. doi: 10.1007/s11033-023-08940-1
IF=2.8; pkt MNiSW=70
4. Wierzbicka A, Semik-Gurgul E, Świątkiewicz M, Szmatoła T, Steg A, Oczkowicz M. Changes in DNA Methylation and mRNA Expression in Lung Tissue after Long-Term Supplementation with an Increased Dose of Cholecalciferol. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 29;25(1):464. doi: 10.3390/ijms25010464
IF=5.6; pkt MNiSW=140

W/w prace powstały w ramach finansowania ze środków własnych Instytutu Zootechniki PIB. Wszystkie prace są współautorskie, przy czym artykuł przeglądowy z udziałem jedynie promotora, a Doktorantka jest w nich pierwszym autorem. Udział Doktorantki w przygotowaniu publikacji nie został przez nią jasno określony i musiał zostać wydedukowany z oświadczeń współautorów oraz opisu udziału autorów zwartego w publikacjach anglojęzycznych. W moim odczuciu rola Doktorantki w badaniach obejmowała: udział w opracowaniu metodyki badań, wykonaniu analiz molekularnych, udziale w analizach danych, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptów oraz współredagowaniu powstałej publikacji. Niemniej jednak, załączone oświadczenia współautorów sugerują, że opracowanie koncepcji badań i podstawowych elementów metodycznych leżało raczej po stronie promotora oraz innych współautorów badań. Ze względu jednak na fakt, że Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach, wnioskuję, że jej rola była wiodąca i wniosła ona relatywnie największy wkład merytoryczny w powstanie wszystkich omawianych publikacji.

Prace stanowiące podstawę dysertacji zostały opatrzone obszernym opracowaniem w języku polskim, w którego skład wchodzi: streszczenie (w języku polskim i angielskim), wstęp, cel pracy doktorskiej oraz skrótowy opis badań uzyskanych w poszczególnych publikacjach, obejmujący materiał i metody wyniki i dyskusję. Opracowanie polskojęzyczne kończą wnioski wyciągnięte ze wszystkich omawianych publikacji, wykaz cytowanej literatury oraz oświadczenia współautorów. Opracowanie obejmuje także kopie opublikowanych prac naukowych, będących podstawą ocenianej rozprawy.

Ocena opracowania w języku polskim

Opracowanie w języku polskim zostało opatrzone tytułem spinającym tematykę wszystkich prac oryginalnych, tj.: „Analiza czynników modulujących efekty suplementacji witaminą D: perspektywa literaturowa, badania transkryptomyczne i epigenomiczne”. Jednostronicowe streszczenie zbyt ogólnie

opisuje całość przeprowadzonych badań, jednak prezentuje najważniejsze wnioski z nich płynące, co rekompensuje nieco brak informacji o materiale badawczym, układzie eksperymentu oraz zastosowanych podejściach metodycznych.

We wstępnych częściach opracowania Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienie supremacji witaminą D. Omawia źródła pokarmowe tej witaminy oraz wspomina o jej możliwych niedoborach w organizmie, powstających w wyniku niekorzystnych warunków środowiskowych oraz błędów żywieniowych. Dalej opisuje chemiczną charakterystykę cząsteczki witaminy D, oraz omawia mechanizm jej syntezy w organizmie. Płynnie przechodzi do metody transportu i metabolizmu pochodnych witaminy D w organizmie. Autorka opisuje też mechanizm działania witaminy D poprzez interakcję z właściwym receptorem oraz mechanizm regulacji jej stężenia we krwi w wyniku ujemnego sprzężenia zwrotnego. W kolejnych akapitach Autorka odnosi się do czynników środowiskowych (dieta i ekspozycja na światło słoneczne) oraz innych, takich jak wiek, stan fizjologiczny, płeć czy kolor skóry, wpływających na poziom witaminy D w organizmie. Sporo miejsca poświęca także rozważaniom nad normami dawkowania tej witaminy, które zdaniem Autorki są niewystarczająco sprecyzowane, a dostępna literatura dostarcza sprzecznych informacji na ich temat.

W mojej ocenie ta część dysertacji jest poprawna merytorycznie, jednak nieco chaotyczna i zbyt ogólna, przez co w niewystarczający sposób zapoznaje czytelnika z problematyką prezentowanych dalej badań. Opis ten powinien bezpośrednio odnosić się do aspektów genetycznych, transkryptomicznych, epigenetycznych i mechanistycznych działania witaminy D, szczególnie, że ciekawa literatura w tym zakresie jest dostępna. Wstęp mógłby także lepiej uzasadniać dobór tkanek. Podane w końcowej części uzasadnienia w tym zakresie są zdawkowe i nieprzekonujące, szczególnie, że najbardziej znamienne efekty kliniczne stosowania witaminy D są obserwowane w układzie kostnym i układzie odpornościowym. Wstęp powinien także zwierać takie klasyczne elementy opisu działania witamin jak skutki niedoboru i hiperwitaminozy (szczególnie, że badane są różne dawki witaminy D). Wprowadzenie podrozdziałów w tej części pracy zwiększyłyby jej przystępność i uporządkowałyby jej zawartość merytoryczną.

Kolejny rozdział pracy stanowią cele pracy doktorskiej. W mojej ocenie cele pracy określone są prawidłowo, jednak ujawniają powinien brak spójności badań wchodzących w skład pracy doktorskiej. Cel pierwszy dotyczy płci jako czynnika modulującego efekty suplementacji witaminą D. Cel drugi dotyczy efektów zwiększonej dawki cholekalcyferolu oraz jej substytucji kalcydiolem na ekspresję mRNA w mięśniu, natomiast pozostałe dwa cele dotyczą zmian ekspresji miRNA, mRNA i metylacji DNA w tkance płuc pod wpływem tych samych czynników. Daje to ważnie braku spójnej koncepcji badań i nieco chaotycznego doboru materiału badawczego. Niemniej jednak, każdy cel badań z osobna urażam za ciekawy i dotyczący zagadnień dotychczas szcątkowo opisanych w dostępnej literaturze

naukowej, szczególnie w odniesieniu do zwierząt gospodarskich. W tym miejscu brakuje także jasno nakreślonej hipotezy badawczej, która wskazałaby na jakie rezultaty autorzy ukierunkowali warsztat badawczy omawianych prac naukowych.

W dalszej części dysertacji w skrótowy sposób Autorka opasuje najważniejsze wyniki uzyskane w ramach opublikowanych prac naukowych.

W przypadku publikacji przeglądowej, Doktorantka podjęła się przeglądu dostępnej literatury dotyczącej różnic w koncentracji witaminy D w osoczu krwi oraz różnic w jej działaniu u ludzi i zwierząt obojga płci. Przegląd ten obejmuje ponad 150 pozycji piśmiennictwa, co świadczy o ogromie pracy wykonanej przy analizie dostępnych danych literaturowych. Przegląd jest dokonany w sposób zorganizowany i systematyczny z podkreśleniem sprzecznych wyników uzyskanych w różnych badaniach. W pierwszych akapitach Autorka próbuje ustalić czy poziom witaminy D różni się pomiędzy poszczególnymi płciami. Pomimo pewnych rozbieżności w analizowanych wynikach, na podstawie przeglądu stwierdza, że płeć jest istotnym czynnikiem warunkującym wystąpienie niedoborów witaminy D. Niemnie jednak, nie tłumaczy, czy niedobry te są wynikiem powiązanych z płcią czynników fizjologicznych i aktualnego stanu fizjologicznego, czy też stylu życia, rodzaju wykonywanej pracy, bądź wynikają z nierzadko odmienniej diety kobiet i mężczyzn. Dalej Autorka skupia się na procesach fizjologicznych, które przebiegają inaczej w organizmach samców i samic, a które mogą być przyczyną różnic w poziomie witaminy D w ich organizmach. Pomimo wskazania szeregu takich procesów, Autorka stwierdza, że istnieją na ten temat sprzeczne dane, co sugeruje wciąż jeszcze niewystarczającą liczbę badań w tym zakresie. W mojej ocenie polskojęzyczne opracowanie dotyczące publikacji przeglądowej jest nieco zbyt skrótowe i nie oddaje w pełni informacji zawartej w opublikowanej pracy. Wartość merytoryczna polskojęzycznego opisu jest niższa niż samej pracy przeglądowej, jednak mimo to stanowi ciekawy przegląd wiedzy na temat zależnych do płci różnic w metabolizmie witaminy D.

W dalszej części opracowania, analiza wpływu płci na efekt działania witaminy D w organizmach nie jest w zasadzie kontynuowana. W publikacji II, pt.: „Effect of different doses of cholecalciferol and calcidiol on meat quality parameters and skeletal muscle transcriptome profiles in swine”, badania skupiają się na określeniu zmian w transkryptomie oraz parametrach jakości mięsa pochodzącego z bliżej nieokreślonego mięśnia świń pod wpływem normalnej i zwiększonej dawki witaminy D oraz zastąpienia cholekalcyferolu, kalcydiolem. Przy opisie tej pracy Autorka nie zamieszcza dodatkowego wprowadzania, czy hipotezy badawczej, w związku z czym nie jest jasne dlaczego podejrzewane są zmiany w jakości mięsa pod wpływem witaminy D. Opis rozpoczyna się od sekcji „materiał i metody”. Dobór grupy badawczej uznaję za prawidłowy. Podobnie jak ogólne założenia metodyczne. Poczucie braku konsekwencji budzi jednak określenie standardowej i

zwieszanej dawki witaminy D, pomimo obszernej dyskusji we wstępnie dotyczącej baki prawidłowych norm witaminy D dla zwierząt gospodarskich. W związku z czym, nie jest dla mnie jasne, na jakiej podstawie dobrano dawki witamin w poszczególnych traktowaniach. Będę wdzięczny za wyjaśnienie w tej kwestii. Opis metodyki nie informuje także jaki dokładnie mięsień był poddany badaniom, jakimi metodami oznaczono parametry jakości mięsa oraz jakie to były parametry. Również opis analiz bioinformatycznych i statystyki jest nieco zbyt ubogi i nie zawiera np. nazw wykorzystywanych testów statystycznych czy cytowania odpowiednich pozycji literatury odnoszących się do poszczególnych, użytych programów.

W połączonych wynikach i dyskusji Autorka w prawidłowy sposób prezentuje otrzymane wyniki analizy RNA-Seq i stwierdza jedynie niewielkie zmiany w transkryptomie komórek mięśniowych pod wpływem różnych dawek i form witaminy D. Autorka sugeruje, że mięśnie mogą nie być tkanką docelową dla witaminy D. To twierdzenie nie wynika z przeprowadzonych badań, gdyż Autorka nie przeprowadziła doświadczenia z ostrym niedoborem witaminy D w mięśniach, a jedynie nie wykryła istotnego wpływu zwiększonej dawki witaminy D na transkryptom mięśnia szkieletowego. Odniosłem również wrażenie, że ocena jakości mięsa była wynikiem innego projektu, nieprzeprowadzonego przez Doktorantkę, co powinno być zaznaczone w opisie metodyki. Pomimo uzyskania raczej negatywnych wyników, dyskusja odnośnie otrzymanych wyników jest ciekawa i poprowadzona z dużą znajomością zagadnienia.

W przypadku publikacji III, prawdopodobnie w rezultacie uzyskania w dużej mierze negatywnych wyników analizy transkryptomu w tkance mięśniowej, Autorka skupiła się na analizie zmian ekspresji szczególnego typu cząstek RNA, jakimi są małe niekodujące RNA w tkance płucnej pod wpływem podwyższonej dawki cholekalcyferolu, zastosowania mieszaniny cholekalcyferolu i kalcydiolu oraz samego kalcydiolu. Tak jak wcześniej wspomniałem, uzasadnienie wyboru tkanki we wstępie jest mgliste a opis publikacji III rozpoczyna się od razu od opisu metodologii, nie dostarczając na ten temat dodatkowych wyjaśnień. Opis metodyki jest merytorycznie poprawny, podobnie jak układ doświadczenia. Niemniej jednak, w dużej części stanowi powtórzenie tekstu zamieszczonego przy opisie metodyki pracy II. Mogło to zostać rozwiane nieco inaczej, gdzie podobnie jak wstęp, opis metodyki mógł być wspólny dla wszystkich prac oryginalnych.

Celem pracy III było określenie wpływu standardowej i zwieszanej dawki cholekalcyferolu oraz kalcydiolu, a także kombinacji obu substancji na ekspresję miRNA w tkance płucnej świń. Zastosowane czynniki badawcze spowodowały jedynie niewielkie zmiany w profilu ekspresji miRNA, jednakże Autorka sprawnie powiązała je z szeregiem procesów, w których bierze udział witamina D oraz szeregiem fizjologicznych konsekwencji zmian w ich ekspresji. Przeprowadziła także analizę genów docelowych dla miRNA oraz powiązanych z nimi ścieżek metabolicznych, i wskazała

potencjalne konsekwencje stosowania poszczególnych dawek i kombinacji form witaminy D₃. Pomimo, że nieco spekulatywna, w mojej ocenie dyskusja nad uzyskanymi wynikami jest merytorycznie poprawna i ciekawa. Zwróciłbym jednak uwagę na zbyt odważne wnioskowanie w końcowych jej fragmentach, dotyczące wpływu kombinacji cholekalcyferol/kalcydiol na procesy nowotworzenia. Taki wniosek wymagałby bardziej specyficznych badań eksperymentalnych, wykorzystujących tkanki nowotworu lub chore zwierzęta. Szkoda, że Autorce nie udało się też potwierdzić zmian w ekspresji wytypowanych miRNA za pomocą metody qPCR. Obniża to nieco wiarygodność uzyskanych wyników i dodatkowo przemawia przeciwko formułowaniu odważnych wniosków, jedynie w oparciu o wyniki NGS.

W pracy IV Autorka podjęła się oceny zmian w metylacji DNA oraz ekspresji genów w tkance płuca pod wpływem zwiększonej dawki cholekalcyferolu. W tej pracy zastosowała taką samą dawkę cholekalcyferolu jak we wcześniejszych badaniach. Opis metodyczny ponownie powtarza elementy wspólne dla wszystkich prac, czego można było unikać, jak wspomniałem wcześniej. Opisy te są w ogromnej mierze klarowne i szczegółowe. Jako wynik, Autorka zidentyfikowała 195 genów o zmienionej ekspresji pod wpływem zwiększonej dawki cholekalcyferolu, z czego w ogromnej większości z nich nastąpiło obniżenie poziomu ekspresji. Ponadto, zidentyfikowała 1116 różnicowo metylowanych miejsc CpG. Autorka w ciekawy sposób wiąże te zmiany z procesami zwłóknienia i nowotworzenia w tkance płucnej. Pomimo, że przedstawione wnioskowanie, przeprowadzone jedynie w oparciu o wyniki NGS i przegląd literatury, jest nieco zbyt daleko idące, to istniejące dane literaturowe nie pozwalają wykluczyć faktycznego istnienia zależności pomiędzy suplementacją witaminą D a nowotworzeniem w tkance płucnej.

W kolejnym, piątym podrozdziale pracy, Autorka prezentuje cztery obszerne wnioski wyciągnięte na podstawie przeprowadzonych badań. Każdy z wniosków odpowiada jednej opublikowanej pracy. Brakuje tu jednak słowa podsumowania wyników płynących ze wszystkich badań. Generalnie wnioski w mojej ocenie są sformułowane prawidłowo. Mam pewne zastrzeżenia jedynie do wniosku czwartego, którego części nie wynikają z przeprowadzonych badań. Autorka twierdzi, że cholekalcyferol może regulować produkcję kolagenu, hamować proces zwłóknienia, posiada właściwości przeciwnowotworowe oraz może regulować poziom witaminy E. Opisane badania nie uwzględniają żadnych analiz potwierdzających te obserwacje. W pracy ustano jedynie, że cholekalcyferol wpływa na ekspresję oraz metylację sekwencji genów powiązanych z tymi procesami, a nie na fenotypową manifestację tych procesów.

Na przystępność polskojęzycznego opisu badań w dużym stopniu negatywnie wpływa brak jakichkolwiek tabel czy wykresów, ułatwiających śledzenie omawianych wyników. Opis zawiera jedynie trzy ryciny poglądowe, dotyczące aspektów działania witaminy D w organizmie. W mojej opinii

wykresy i tabele powinny się pojawiać w polskojęzycznym opisie, jako, że jest on właściwą dysertacją i głównie on podlega ocenie merytorycznej przez recenzentów w przewodzie doktorskim. W całości opisu Autorka nie ustrzegła się drobnych błędów merytorycznych, językowych i stylistycznych, jednak nie są one liczne i nie wpływają na ogólny odbiór pracy. Pewien brak spójności tematyki badań w poszczególnych pracach zrzucam na karb mniejszych niż oczekiwane efektów płci czy dawki witaminy D w mięśniach, co zmusiło Autorkę do zmiany koncepcji badań i wyboru innego materiału badawczego.

Następujący po wnioskach wykaz piśmiennictwa zawiera głównie nowe pozycje literatury, co świadczy o aktualności stanu wiedzy przedstawionego w dysertacji.

Pomimo szeregu uwag krytycznych, które z przyzwyczajenia recenzenta zawarłem w powyższej ocenie polskojęzycznego opisu badań, przedstawione opracowanie uważam za poprawne a zawarte w nim wiadomości za wystarczające, choć znacznie uboższe niż zaprezentowane w opublikowanych pracach. Opis jest czytelny, przejrzysty, jasny dla czytelnika, a język opracowania jest poprawny i wystarczająco ścisły. Świadczy to o dobrej znajomości technik badawczych i tematyki badań, czyniąc Autorkę obiecującym kandydatem na pracownika naukowego.

Wartość merytoryczna publikacji naukowych

Suplementacja witaminą D jest kluczowa dla zdrowia zwierząt hodowlanych. Witamina D odgrywa istotną rolę w regulacji metabolizmu wapnia i fosforu, co jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju kości i zębów. U świń, niedobór witaminy D może prowadzić do problemów zdrowotnych, takich jak krzywica, osteomalacja i osłabienie układu immunologicznego. Regularna suplementacja pomaga również w zapobieganiu chorobom układu kostnego oraz wspiera ogólną kondycję zdrowotną zwierząt, co przekłada się na lepsze wyniki hodowlane. W przypadku świń utrzymywanych w warunkach ograniczonego dostępu do światła słonecznego, suplementacja witaminą D jest szczególnie ważna, ponieważ naturalna synteza tej witaminy w skórze jest ograniczona. Różne czynniki, jak płeć, wiek, sposób żywienia, stan fizjologiczny i system hodowli mogą mieć wpływ na zapotrzebowanie na witaminę D. Witamina D może też w różny sposób ulegać metabolizmowi, bądź mieć różną aktywność w różnych stanach fizjologicznych i różnych tkankach. Przykładowo, samce i samice mogą mieć różne proporcje tkanki tłuszczowej i mięśniowej, co wpływa na magazynowanie i dostępność witaminy D. Również mechanizm działania witaminy D w różnych warunkach i otoczeniu biochemicznym może być inny. W pracach naukowych będących podstawą ocenianej dysertacji Autorka podejmuje się rozpoznania wybranych czynników, które mogą wpływać na działanie i funkcje witaminy D w organizmie. Cele te realizuje z wykorzystaniem nowoczesnych technik genetyki

molekularnej, dostarczając pionierskich informacji, które na nowo otwierają dyskusję odnośnie skutków i sposobów działania witaminy D w organizmie. Prezentowanie badania zawierają w sobie element mechanistyczny, identyfikując elementy mechanizmu działania witaminy D w poszczególnych tkankach. Połącznie dobrze dobranych eksperymentów na zwierzętach, nowoczesnych technik badawczych i zaawansowanych analiz bioinformatycznych czyni zaprezentowane prace wartościowymi pozycjami literatury, na poziomie poczytnej literatury światowej w tym zakresie.

Wskaźniki bibliometryczne prac wchodzących w skład dysertacji oceniam bardzo wysoko. Łączna liczba punktów ministerialnych opublikowanych prac wynosi 450, a łączny wskaźnik IF, 19,1. Tak wysokie wartości punktowe znacznie przekraczają te powszechnie obserwowane przy ubieganiu się o stopień naukowy doktora i są zbliżone nawet do punktacji osiągnięć będących podstawą w postępowaniach habilitacyjnych.

Podsumowanie

Pomimo pewnych niedociągnięć, które z obowiązku recenzenta wykazałem w polskojęzycznym opracowaniu, całość dysertacji oceniam bardzo pozytywnie. Wartość punktowa publikacji wchodzących w skład dysertacji jest bardzo wysoka. Oryginały wkład i jakość opisu zaprezentowanych prac czyni je w mojej ocenie więcej niż wystarczającymi do promocji Autorki na stopień naukowy doktora.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca pt.: „Analiza czynników modulujących efekty suplementacji witaminą D: perspektywa literaturowa, badania transkryptomyczne i epigenomiczne” spełnia wymagania określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t. j. Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.), i niniejszym wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Zootechniki PIB o dopuszczenie Pani mgr inż. Alicji Wierzbickiej do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Wnoszę także do Wysokiej Rady Instytutu Zootechniki PIB o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej i przyznanie Autorce regulaminowej nagrody.

