

Toruń, 02.08.2024

Dr hab. inż. Anna Sławińska, Prof. UMK

Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych
Lwowska 1, 87-100 Toruń
Kom. 504-750-889
e-mail: slawinska@umk.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr inż. Alicji Wierzbickiej

pt. „Analiza czynników modulujących efekty suplementacji witaminą D: perspektywa literaturowa, badania transkryptomyczne i epigenetyczne”

W związku z powierzoną mi funkcją recenzentki w postępowaniu doktorskim Pani mgr inż. Alicji Wierzbickiej, na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego z dnia 22 marca 2024 roku, niniejszym przedstawiam recenzję rozprawy doktorskiej pt. *„Analiza czynników modulujących efekty suplementacji witaminą D: perspektywa literaturowa, badania transkryptomyczne i epigenetyczne”*. Rozprawa ta została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt, pod opieką Promotor, dr hab. Marii Oczkowicz, prof. IZ oraz Promotor pomocniczej, dr inż. Anny Koseniuk.

1. Ocena metodyczna

Recenzja została przygotowana w oparciu o przesłany mi egzemplarz rozprawy doktorskiej. Rozprawa doktorska bazuje na cyklu czterech powiązanych tematycznie publikacji naukowych. Publikacje te obejmują jedną pracę przeglądową oraz trzy oryginalne prace badawcze. W ujęciu naukowym, prace wchodzące w cykl zostały opublikowane w cenionych czasopiśmie naukowych (Q1 i Q2 z obszarów *food science*, *molecular biology* lub *medicine misc.*). Ich sumaryczna wartość *Impact Factor* wynosi 21, a sumaryczna liczba punktów MEIN wynosi 450. Według informacji z bazy Google Scholar, prace te były łącznie cytowane 47 razy, z czego publikacja przeglądowa (publikacja 1) uzyskała aż 45 cytowań. Manuskrypt rozprawy doktorskiej liczy 45 stron i został podzielony na następujące rozdziały: (1) Streszczenie (w języku polskim i angielskim), (2) Wstęp, (3) Cele pracy doktorskiej, (4) Cykl publikacji, (5) Wnioski oraz (6) Bibliografia. Układ pracy doktorskiej obejmuje wszystkie elementy charakterystyczne dla rozpraw naukowych. Najbardziej obszerną częścią rozprawy doktorskiej jest opis cyklu publikacji (27 stron), zawierający syntetycznie przedstawione informacje zawarte w każdej z czterech publikacji wchodzących w skład cyklu. Bibliografia zawarta w rozprawie doktorskiej liczy 94 pozycje, w większości stanowiące cytowania innych prac naukowych, ale również raportów grup roboczych (np. EFSA). Ponad połowa prac cytowanych w bibliografii obejmuje najnowsze doniesienia naukowe (datowane na lata 2018 i późniejsze). Istotną częścią rozprawy doktorskiej są załączniki, obejmujące oświadczenia autorskie współautorów opublikowanych prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji oraz kopie

tych prac. Wszystkie prace są współautorskie, a rola poszczególnych współautorów w powstanie prac została określona w załączonych oświadczeniach współautora. Pani mgr inż. Alicja Wierzbicka jest pierwszą autorką każdej z czterech prac wchodzącej w skład cyklu, co potwierdza Jej wiodący udział. W załącznikach do rozprawy doktorskiej nie znalazłam oświadczenia Doktorantki zawierającego wyspecyfikowanie Jej wkładu autorskiego do prac wchodzących w skład cyklu. Z lektury *Authorship statement* zawartych w kopiach publikacji wynika, że Pani mgr inż. Alicja Wierzbicka była zaangażowana w takie działania jak: *methodology, investigation, validation, software, visualisation, data curation* oraz *writing (original draft & review)*. Na liście współautorów nie widnieje nazwisko Pani Promotor pomocniczej, dr inż. Anny Koseniuk. W podsumowaniu, pod względem metodycznym, rozprawa doktorska Pani mgr inż. Alicji Wierzbickiej jest przygotowana zgodnie z najwyższymi standardami.

2. Ocena merytoryczna

2.1. Tematyka i hipotezy badawcze

Tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy różnych aspektów działania witaminy D w organizmie człowieka (badania literaturowe) i świni (badania eksperymentalne). Taka struktura pracy może wydać się zaskakująca, biorąc pod uwagę, że teoretyczna i praktyczna część pracy została przeprowadzona na odrębnych modelach biologicznych. Było to jednak, moim zdaniem, znakomite rozwiązanie, pozwalające na zacerpnięcie z bogatej literatury dotyczącej efektów witaminy D u ludzi oraz możliwości eksperymentowania na organizmie świni. Wiadome jest, że świnia jest modelem anatomicznym, genetycznym i fizjologicznym dla człowieka, i odwrotnie¹. Ponadto, jak Autorka podkreśla we wstępie, mimo ogromnej roli przypisywanej witaminie D w wielu procesach fizjologicznych, dopiero w ostatnich latach stało się jasne, że znakomita część populacji ludzkiej ma niedobory witaminy D. Dzięki temu, powstały badania epidemiologiczne przeprowadzone na dużych populacjach, które pozwoliły na szersze spojrzenie na efekty witaminy D w organizmie, w tym różnice międzypłciowe. W odniesieniu do zwierząt gospodarskich, wątek niedoborów witaminy D w diecie stanowi od niedawna temat prac badawczych. Maksymalne dzienne dawki witaminy D są określone w rozporządzeniu Komisji Europejskiej na poziomie 2000 IU/kg paszy, jednak pojawiają się głosy dotyczące zmiany tych norm. W swojej rozprawie, Autorka postawiła cztery hipotezy badawcze, odnoszące się do różnic międzypłciowych w poziomie i działaniu witaminy D oraz efektów molekularnych wywołanych suplementacją witaminy D. W kontekście postawionych hipotez mam następujące pytanie:

Pytanie 1. *Hipoteza pierwsza dotyczy efektu płci w badaniach literaturowych u ludzi. W pracy eksperymentalnej na świniami zachowane zostały równe proporcje płci. Dlaczego nie została postawiona hipoteza wpływu płci na odpowiedź na zadany czynnik eksperymentalny (suplementację różnych dawek i form witaminy D)?*

2.2. Badania literaturowe

W części literaturowej (**Publikacja 1**), Autorka dokonała obszernego przeglądu literatury związanej z biosyntezą i metabolizmem witaminy D w organizmie człowieka, poziomów fizjologicznych witaminy D i różnic międzypłciowych oraz udziału witaminy D w stanach

¹ N. Hou (2022) Advances in pig models of human diseases. *Animal Model Exp. Med.* 5: 141-152.

patologicznych (w tkankach szkieletowych i nieszkieletowych) kobiet i mężczyzn. Praca ta, niezwykle obszerna i opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *British Journal of Nutrition*, doczekała się aż 45 cytowań (wg. Google scholar). Obejmuje ona wiele aspektów związanych z metabolizmem i funkcją witaminy D u ludzi. Autorka cytuje w tej pracy 151 prac badawczych i wykazuje zróżnicowane efekty niedoborów i suplementacji witaminy D, z podkreśleniem znaczących różnic między płcią żeńską i męską. Praca ta stanowi doskonałe wprowadzenie literaturowe do części eksperymentalnej. Tym bardziej, w dalszej części rozprawy zabrakło wątków poruszonych w tej znakomitej pracy przeglądowej, takich jak efekt płci.

2.3. Badania eksperymentalne

Część eksperymentalna niniejszej rozprawy doktorskiej została oparta o jedno doświadczenie żywieniowe przeprowadzone na świnich skarmianych paszami suplementowanymi różnymi formami i dawkami witaminy D (**Publikacje 2-4**). Zwierzęta podzielono na cztery grupy. **Grupa (1, kontrolna)** otrzymywała suplementację cholekalcyferol w maksymalnej dopuszczanej dawce. Kolejne grupy doświadczalne otrzymały: **(2)** podwyższoną dawkę cholekalcyferolu, **(3)** podwyższoną dawkę cholekalcyferolu + kalcydiol oraz **(4)** sam kalcydiol w jednostkach odpowiadających standardowej dawce cholekalcyferolu. Po zakończeniu tuczu, zwierzęta poddano eutanacji i pobrano próbki materiału biologicznego do badań. W osoczu krwi wszystkich zwierząt eksperymentalnych zmierzono poziom całkowitego stężenia witaminy D. Zgodnie z założeniem, poziom 25(OH)D był najniższy w grupach 1 i 2, a najwyższy w grupach 3 i 4. Wszystkie grupy eksperymentalne różniły się od grupy kontrolnej.

***Pytanie 2.** Czy wykonano analizę wariancji poziomu 25(OH)D z uwzględnieniem płci jako czynnika? Czy w przypadku świń występują różnice w poziomie witaminy D związane z płcią?*

***Pytanie 3.** Czy przy planowaniu badań rozważono, żeby w układzie eksperymentalnym wystąpiła kontrola negatywna, niesuplementowana witaminą D? Mogłoby to dać lepszy kontrast w badaniach jakości mięsa i badaniach transkryptomicznych.*

Pobrane próbki obejmowały dwa rodzaje tkanek: próbki mięśnia najdłuższego (*longissimus*) oraz próbki płuc. W próbkach tkanki mięśnia najdłuższego przeprowadzono analizę ekspresji RNAseq oraz kompleksową analizę jakości mięsa (**Publikacja 2**). W próbkach pobranych z płuc przeprowadzono analizy ekspresji miRNA (**Publikacja 3**) oraz methylSeq (**Publikacja 4**). Wyniki poddano szczegółowej analizie bioinformatycznej. Wyniki wykazały, że podanie wyższych dawek witaminy D w paszy świń i/lub zamiana jej formy z cholekalcyferol na kalcydiol jest bezpieczne dla zwierząt i nie powoduje negatywnego wpływu na jakość mięsa (**Publikacja 2**). Autorka słusznie zauważa, że warto było poddać próbki mięsa badaniom na poziom witaminy D, co mogłoby się przełożyć na praktyczny efekt dla producentów i konsumentów żywności. Z drugiej strony, podawanie wyższych dawek witaminy D nie wpłynęło na zmiany transkryptomiczne w mięśni najdłuższym. Nie jest to zaskakujące, skoro sama Autorka podkreśla w wielu miejscach, że jednym z docelowych układów, w których witamina D wykazuje znaczące działanie, jest układ immunologiczny.

Tutaj dochodzimy do drugiej części prac eksperymentalnych, w których dokonano analiz transkryptomicznych i epigenetycznych w obrębie tkanki płucnej zdrowych zwierząt (**Publikacja 3 i 4**). Autorka argumentuje, że płuca są narażone często na kurz występujący w obiektach gospodarskich, w których przebywają świnie. Płuca stały się również popularne wśród badawczy w kontekście

pandemii COVID-19, podczas której wykazano wiele negatywnych efektów choroby w obrębie układu oddechowego. Tym niemniej, zwierzęta eksperymentalne wykorzystane do badań w niniejszej rozprawie doktorskiej, były zdrowe, co utrudniało powiązanie suplementacji ze statusem zdrowotnym układu oddechowego. Kolejne pytania nasuwają się po lekturze tej części rozprawy doktorskiej:

Pytanie 4. *Czy płuca poddano analizie fenotypowej, np. analizie histopatologicznej, która mogłaby wykazać rzeczywisty wpływ suplementacji witaminą D na zmiany w obrębie tkanek?*

Pytanie 5. *Czy Autorzy planują dalsze badania związane z podawaniem zwiększonych dawek witaminy D zwierzętom chorym albo poddanym stresowi? Jakie są doniesienia literaturowe w tym zakresie?*

W **Publikacji 3** Autorka bardzo szczegółowo przedstawia analizę ekspresji miRNA w tkance płuc we wszystkich czterech grupach zwierząt, suplementowanych cholekalcyferolem i kalcydiolem. Wyniki wskazują na to, że między grupą 1 i 2, różniącą się jedynie dawką cholekalcyferolu, jedyna różnica w ekspresji miRNA występuje w miR-215-5p. Natomiast, więcej *loci* miRNA wykazuje różnice w ekspresji, gdy porównywane są również grupy 3 i 4, które w suplementacji otrzymały kalcydiol i miały najwyższy poziom witaminy D w osoczu. Natomiast, **Publikacja 4**, która zawiera wyniki analiz transkryptomicznych i metylacji DNA w płucach, została ograniczona do dwóch grup (1 i 2), suplementowanych tylko cholekalcyferolem. Wyniki zawarte w publikacji 4 obejmują bardzo ciekawe spostrzeżenia, że zwiększona suplementacja cholekalcyferolem doprowadziła do negatywnej regulacji ekspresji genów. Autorka podkreśla, że te wyniki, są w sprzeczności ze znanym z literatury wpływem witaminy D na zwiększenie aktywności transkrypcji RNA, a nie jej obniżenia. Ponadto, wyniki metylSeq wskazują również na zwiększony poziom metylacji DNA w grupie suplementowanej wyższą dawką cholekalcyferolu. W tej publikacji brakuje grup 3 i 4, obejmujących zwierzęta suplementowane kalcydiolem, które mogłyby przynieść dużo ciekawych informacji na temat wpływu tej formy witaminy D na transkryptom i metylom tkanki płucnej świń. W rozprawie doktorskiej nie znalazłam informacji na ten temat.

Pytanie 6. *Proszę wytłumaczyć, dlaczego w Publikacji 4 nie uwzględniono grup 3 i 4, suplementowanych kalcydiolem, w odniesieniu do badań transkryptomicznych i epigenetycznych?*

2.4. Wnioski

W oparciu o omawiane wyniki pracy doktorskiej, Autorka sformułowała cztery wnioski, odnoszące się do założonych hipotez. W zakresie wniosków, mam wątpliwość o wniosek trzeci, brzmiący następująco: „(...) zastąpienie cholekalcyferolu kalcydiolem nie wywołuje żadnych zmian w ekspresji miRNA w tkance płuc”. Zgodnie z tabelą 1 zawartą w Publikacji 2, grupy zwierząt suplementowanych kalcydiolem (3 i 4) wykazały więcej zmian w zakresie ekspresji miRNA, niż grupy suplementowane cholekalcyferolem (1 i 2). Proszę wyjaśnić.

3. Podsumowanie

W podsumowaniu pragnę podkreślić wysokie walory badawcze i aplikacyjne przedstawionej pracy doktorskiej. Badania nad witaminą D są szczególnie istotne dla poprawy statusu zdrowotnego ludzi i zwierząt. Autorka popisała się erudycją i znajomością literatury, jak również szlaków metabolicznych, w których witamina D bierze udział. Jednak, w drugiej części pracy zabrakło odniesienia do cech fenotypowych, które mogłyby poprzeć badania molekularne. W ostatniej publikacji wyraźnie brakowało danych na temat grup suplementowanych kalcydiolem.



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

W oparciu o przytoczone argumenty, stwierdzam że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Alicji Wierzbickiej spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2023 r. poz.742). W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Zootechniki wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Alicji Wierzbickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,