

Prof. dr hab. Emilia Bagnicka  
Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki  
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

### **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr. inż. Łukasza Wodasa  
pt. „Ocena związku polimorfizmów genów kodujących białka serwatkowe mleka klaczy  
(LGB1, LGB2, LALBA) z poziomem ich ekspresji”  
wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Jakuba Cieślaka - Promotora  
oraz dr. inż. Mariusza Maćkowskiego – Promotora pomocniczego  
w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo  
na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu,  
Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach,  
Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt.**

Rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Łukasza Wodasa dotyczy analizy molekularnej genów alfa-laktoalbuminy (*LALBA*) oraz beta-laktoglobuliny 1 i 2 (*LGB1*, *LGB2*) przeprowadzonej dla kilkunastu ras koni utrzymywanych w Polsce oraz analizy asocjacyjnej między polimorfizmem badanych genów a ich ekspresją na poziomie mRNA i białka oraz podstawowym składem chemicznym mleka klaczy trzech ras, należących do odległych typów koni tj. konik polski (typ prymitywny), polski koń szlachetny półkrwi, od bieżącego roku zwany polskim koniem sportowym (typ gorącokrwisty) oraz polski koń zimnokrwisty (typ zimnokrwisty).

Mimo, iż użytkowanie mleczne jest jedną z pierwszych form użytkowania konia domowego udomowionego ok. 5500 lat temu, obecnie mleko klaczy ma niewielki udział w światowej produkcji mleka. Jednak w Azji Środkowej mleko klaczy w dalszym ciągu wykorzystywane jest do produkcji napoju alkoholowego – kumysu. W Europie mleko tego gatunku było również wykorzystywane w leczeniu chorób układu pokarmowego i oddechowego oraz migren. Jednak w XX wieku, prawdopodobnie wraz z rozwojem współczesnej medycyny, zapomniano o jego leczniczych właściwościach. Jednakże od początku obecnego wieku w krajach rozwiniętych takich jak Niemcy, Francja, Włochy, Austria, czy USA mleko to wzbudza zainteresowanie naukowców ze względu na swój skład zbliżony do składu mleka kobiecego i możliwość jego zastosowania jako substytutu w żywieniu niemowląt i dzieci, zwłaszcza dotkniętych alergią na mleko krowie, czy kozie. Znajduje też zastosowanie jako suplement diety w żywieniu osób starszych, czy rekonwalescentów w celu wzmocnienia organizmu. Jest chętnie wykorzystywane do produkcji kosmetyków. Obecnie w Polsce użytkowanie mleczne jest uwzględnione w programach ochrony koni zimnokrwistych (sztumskie, sokólskie) jako alternatywna użytkowość dla tych ras.

Zatem podjęcie tej tematyki uważam za w pełni uzasadnione. Dotyczy ona aktualnych zagadnień, a otrzymane wyniki mają duże znaczenie nie tylko poznawcze, ale i aplikacyjne, np. wykorzystanie informacji o asocjacjach miejsc polimorficznych genów białek mleka z zawartością ich produktów białkowych oraz innych składników mleka w programach hodowlanych. Ponadto wykorzystanie mleka kłaczy jako substytutu mleka kobiecego dla niemowlaków również wymaga dogłębnych analiz.

Badania nad składem mleka kłaczy prowadzone są w Polsce w kilku jednostkach naukowych, w tym na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie, Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie oraz na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. Natomiast badania dotyczące genetycznego podłoża składu mleka kłaczy w Polsce prowadzone są, zgodnie z moją wiedzą, jedynie przez zespół dr. hab. Jakuba Cieślaka na UP w Poznaniu. W ramach pracy tego zespołu powstał przedstawiony mi do oceny doktorat. Wcześniejsze badania zespołu, w których Doktorant również uczestniczył, dotyczyły polimorfizmu genów kazein oraz lizozymu i laktoferyny oraz asocjacji tych polimorfizmów z zawartością produktów białkowych badanych genów. Naturalną kontynuacją pracy zespołu była więc analiza polimorfizmów dwóch głównych białek serwatkowych tj. alfa-laktoalbuminy i beta-laktoglobuliny. Są to unikatowe badania w Polsce i jedne z nielicznych na świecie jeżeli chodzi o ten gatunek zwierzęcia. Badania te prowadzono w ramach dwóch projektów: SONATA 2011/03/D/NZ9/05337, którego kierownikiem był Promotor Doktoranta oraz projektu PRELUDIUM 2016/21/N/NZ9/01350, którego kierownikiem był sam Doktorant.

Na przedstawioną do oceny pracę składają się dwie spójne tematycznie publikacje oryginalne, opublikowane w latach 2018 i 2020:

1. Wodas, Ł., Maćkowski, M., Borowska, A., Pawlak, P., Puppel, K., Kuczyńska, B., Czyżak-Runowska G., Wójtowski J. & Cieślak, J. (2018). *5'-flanking variants of the equine  $\alpha$ -lactalbumin (LALBA) gene—relationship with gene expression and mare's milk composition. J. Anim. Feed Sci., 27(4), 317-326.*
2. Wodas, L., Maćkowski, M., Borowska, A., Puppel, K., Kuczyńska, B., & Cieślak, J. (2020). *Genes encoding equine  $\beta$ -lactoglobulin (LGB1 and LGB2): Polymorphism, expression, and impact on milk composition. PloS one, 15(4), e0232066.*

Impact Factor (IF) czasopisma *Journal of Animal and Feed Sciences* w roku ukazania się publikacji był równy 0,875 (obecnie wynosi 1,150) i czasopismo plasowało się w kwartyle trzecim obszarów *Animal Science and Zoology i Food Science*. Wydawnictwo znajdowało się na liście czasopism naukowych MNiSW z liczbą 20 pkt. (lata 2010-2017).

Aktualny IF czasopisma *PloS one* wynosi 2,740, co plasuje to czasopismo wg. bazy Web of Science w Q2 w obszarze nauk multidyscyplinarnych (*Multidisciplinary Sciences*). W wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MEiN czasopismu przypisano 100 pkt.

Sumaryczny IF rozprawy wynosi 3,615, co w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo jest bardzo dobrym osiągnięciem. Zsumowanie punktów MNiSW i MEiN jest niemożliwe, ze względu na dwie różne skale ocen.

W obu pracach Doktorant jest pierwszym autorem. Do opracowania dołączono oświadczenia zarówno Doktoranta, jak i współautorów, w których dokładnie przedstawiono wkład pracy każdego ze współautorów oraz ich udział procentowy. Z oświadczeń wynika, iż wkład Doktoranta w powstanie prac był wiodący, wynosił odpowiednio 55 i 60% i polegał przede wszystkim na kolekcjonowaniu materiału do badań, wykonaniu analiz molekularnych (izolacja DNA, projektowanie starterów, przeprowadzenie PCR i RT-qPCR, sekwencjonowanie metodą Sanger), interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptów artykułów oraz współudziale w odpowiedziach na recenzje. W oświadczeniach zabrakło informacji o przeprowadzeniu analiz bioinformatycznych przez Doktoranta – informacja taka znalazła się w rozdziale wyniki, po omówieniu rezultatów każdej z prac. Należy podkreślić, że Doktorant opanował konieczne metody analiz biologii molekularnej, a jedynie zawartość produktów białkowych badanych genów w mleku klaczy wykonana była we współpracy z zespołem prof. Beaty Kuczyńskiej z SGGW w Warszawie.

Wyżej wymienione prace zostały opatrzone omówieniem w języku polskim, ze streszczeniem w języku polskim i angielskim. Informacje zawarte w pracy 1 uzupełniono o jeszcze nie opublikowane wyniki.

Dysertację rozpoczyna wykaz skrótów, w których jednak zabrakło skrótów nazw ras koni. Ponadto w języku polskim gen *LALBA* to gen alfa-laktoalbuminy a nie laktalbuminy.

We wstępie liczącym 12 stron, zawierającym 4 rysunki i dwie tabele, doktorant przedstawił krótko rys historyczny wykorzystywania mleka klaczy w żywieniu człowieka oraz wskazał na ograniczenia użytkowania mlecznego tego gatunku, mimo, iż wydajność dzienna klaczy jest moim zdaniem wysoka – ok. 20 litrów w szczycie laktacji. Kolejny podrozdział wstępu poświęcony jest omówieniu składu siary i mleka, ich wartości odżywczej dla sysaków i porównaniu do składu mleka kobiecego i krowiego. Czy w zestawieniu nie powinny znaleźć się informacje o mleku kozim również polecanym w żywieniu dzieci? Doktorant wymienił również czynniki wpływające na skład mleka klaczy. Szczególny nacisk Doktorant położył na omówienie frakcji białkowych mleka. Kolejne dwa rozdziały poświęcił scharakteryzowaniu badanych genów oraz ich produktów białkowych. W ostatnim podrozdziale dokonał przeglądu literatury dotyczącej związku polimorficznych form badanych genów z cechami mleka, podkreślając, że liczba prowadzonych dotychczas badań w tym obszarze jest bardzo ograniczona. Ponadto dotychczasowe badania skupiały się na sekwencjach części kodujących genów, natomiast badania przedstawione w dysertacji dotyczą również analiz części regulatorowych genów. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na nierozwinięcia skrótów nazw aminokwasów przedstawionych w tabeli 2. Zabrakło mi też informacji we wstępie do dysertacji oraz we wstępach do obu prac o składzie komórek somatycznych obecnych w mleku klaczy – jaki jest w nich udział złączonych komórek nabłonkowych o funkcji wydzielniczej w stosunku do leukocytów migrujących z krwi. Były one materiałem do badań ekspresji genów. Ogólna informacja dotycząca składu komórek somatycznych w mleku klaczy pojawia się dopiero w dyskusji pracy 2.

Następny rozdział dysertacji przedstawia hipotezę i cel badań. Hipoteza jest słuszna, mam jednak uwagę do jej sformułowania – zamiast formy „mogą wpływać” powinno być „wpływają”.

Doktorant przedstawił cel swojej pracy jako analizę molekularną genów *LALBA*, *LGB1* i *LGB2* konia domowego, obejmującą:

1. poszukiwanie polimorfizmów w ich częściach kodujących i regulatorowych

2. analizę względnego poziomu ich transkryptów w komórkach somatycznych mleka kłaczy
3. ocenę potencjalnego związku polimorfizmów z poziomem ekspresji genów mierzonych na etapie mRNA i białka oraz z wybranymi cechami składu mleka.

W składowych celu zabrakło informacji o analizie stężenia produktów białkowych badanych genów. Nie były one wprawdzie osobiście wykonane przez Doktoranta, ale stanowią integralną część pracy, zostały przeprowadzone na tym samym materiale i we współpracy z zespołem naukowców z SGGW.

W kolejnym rozdziale Doktorant w sposób jasny przedstawił szczegółową metodykę swych badań. Metodyki analiz zostały przedstawione w opublikowanych artykułach, podlegały już zatem recenzji i są adekwatne do zaplanowanego zakresu badań. Należy podkreślić zakres analiz sekwencji genów – w przypadku genu *LALBA* było to 1115 pz regionu 5' flankującego, natomiast w przypadku dwóch genów laktoglobulin przeanalizowano całe sekwencje każdego z genów, po ok. 7000 pz, a analizowane były, poza regionem 5' flankującym także eksony i introny. W tym celu zaprojektowano 26 par primerów. W przypadku genu *LALBA* nieopublikowane informacje o analizie związku polimorfizmów części strukturalnej genu z poziomem jego ekspresji i składem chemicznym mleka zostały przedstawiono jako uzupełnienie do pracy nr 1. Rozumiem, że zostaną wkrótce opublikowane.

Zarówno w przedstawionej dysertacji, jak i opublikowanych pracach zabrakło informacji dlaczego do analiz asocjacyjnych wybrano jedynie trzy rasy koni, czy osobniki 12 ras do poszukiwania nowych polimorfizmów genów były wybrane losowo i czy zwrócono uwagę na spokrewnienia w obrębie rasy. W obu artykułach oraz opracowaniu nie podano jaki materiał był wykorzystany do izolacji DNA do analiz PCR i sekwencjonowania. Tabela 11 opracowania, dotycząca wykorzystywanych primerów w RT-qPCR zawiera identyczne informacje odnośnie temperatury przyłączania i użytej polimerazy, mogły być one zatem pomięte w tabeli, a przedstawione jedynie w tekście pracy. Podano informację, że skład mleka był analizowany za pomocą aparatu MilkoScan FT2, jednak nie podano rodzaju kalibracji (czy zastosowano, zwykle stosowane do analiz mleka różnych gatunków zwierząt, kalibracje na mleko krowie, czy jednak zespół dysponuje kalibracją na mleko kłaczy). W rozdziale poświęconym analizie statystycznej podano, iż oszacowano korelacje rangowe między poziomem mRNA genów *LGB1* i *LGB2* oraz ich produktami białkowymi i zawartością białka ogólnego w mleku kłaczy. Analogiczne analizy można przeprowadzić również dla genu *LALBA*.

Wyniki poszczególnych prac przedstawiono w osobnych podrozdziałach.

W pracy 1 Doktorant podał, iż alfa-laktoalbumina odgrywa istotną rolę w laktogenezie, dlatego też spodziewał się znaleźć asocjacje między polimorfizmem genu *LALBA* i zawartością laktozy. Może zasadne byłoby oszacowanie korelacji między zawartością tego białka i laktozy w mleku?

W opisie wyników pracy 2 podano, iż poziomy mRNA obu genów *LGB* wzrosły w 15 tygodniu w stosunku do 10, ale zmiana była istotna statystycznie tylko w odniesieniu do *LGB1* (ostanie zdanie str. 36, kończące się na str. 37). Jest to niepoprawnie przedstawiona informacja. Jeżeli różnice nie są potwierdzone statystycznie oznacza to, że są przypadkowe, stwierdza się więc brak różnic.

Rozprawę kończy krótka dyskusja, łączna dla obu prac. W części tej Doktorant omówił i zinterpretował uzyskane wyniki oraz skonfrontował je z danymi literaturowymi, przede wszystkim informacjami uzyskanymi w badaniach na innych gatunkach zwierząt z braku odpowiedniej literatury

dotyczącej konia domowego. W przypadku genu *LALBA* (mRNA) oraz *LGB1* (mRNA i białko) stwierdzono najwyższy poziom w 5 tygodniu laktacji, znaczny spadek w 10 dniu i ponowny wzrost w 15 tygodniu laktacji. Odnośnie najwyższej ekspresji genu *LALBA* w 5 dniu laktacji stwierdzono, iż jest to prawdopodobnie związane z zapotrzebowaniem nowo narodzonego źrebięcia na czynniki przeciwzapalne. Niestety, nie podano czym można wyjaśnić wzrost poziomu mRNA genu *LALBA* w 15 tygodniu laktacji.

W aspekcie materiału do badań ekspresji genów, czyli komórek somatycznych obecnych w mleku, w pracy 2 autorzy dywagują nad ewentualnym wpływem braku homogenności materiału na wyniki tej ekspresji. Przypuszczają, że brak możliwości wydzielenia z całej puli komórek wydzielniczych mogło wpłynąć na wyniki dotyczące poziomu transkryptów ze względu na różną liczbę komórek wydzielniczych obecnych w pelecie komórkowym w każdej z prób. Jak sami autorzy wskazują, wykorzystanie odpowiedniego genu referencyjnego, który, podobnie jak geny białek mleka nie są ekspymowane w leukocytach pozwala na normalizację wyników między próbami. Zatem obecność leukocytów w puli komórek i mRNA z nich wyizolowanego nie powinna wpłynąć na wyniki. Komórki somatyczne obecne w mleku krów i kóz są częstym materiałem do badań ekspresji różnych genów, co również zostało w artykule podkreślone.

Ósmy rozdział dysertacji stanowią „Wnioski”, jednak powinien on być zatytułowany „Podsumowanie i wnioski”, gdyż tylko dwa z przedstawionych pięciu punktów to prawidłowo sformułowane wnioski, a trzy pierwsze to podsumowanie uzyskanych wyników. Podsumowanie poświęcone jest jedynie wynikom asocjacyjnym, a wyniki dotyczące różnic rasowych oraz zmian ekspresji genów w przebiegu laktacji są także interesujące. Równie istotna informacja dotyczy możliwości, a raczej braku możliwości określenia zawartości poszczególnych frakcji beta-laktoglobuliny z powodu braku odpowiednich standardów.

Wniosek nr 4, dotyczący braku liniowej zależności między ekspresją genów na poziomie mRNA i białka mógłby być uzupełniony o stwierdzenie, które zresztą pojawiło się w pracy nr 1, iż badania nad ekspresją genu powinny być prowadzone na obu poziomach. Na podstawie tej informacji można wytyczyć również kierunek przyszłych badań – np. analiza zjawisk epigenomicznych.

Kolejny rozdział to Literatura, zawierająca 56 pozycji o zasięgu światowym, w większości opublikowanych w ostatnich 20 latach. Niedociągnięcia redakcyjne w tej części pracy: w pozycji 4 brak kompletnych danych wydawniczych; w pozycji 39 podano jedynie autorów pracy, bez pozostałych danych bibliograficznych; różny jest styl prezentacji bibliografii.

Następnie załączono oba artykuły w kolejności ich ukazania się. Praca 2 zawiera materiały uzupełniające; większość informacji w nich zawartych zostało przedstawione w dysertacji.

Dysertację kończą oświadczenia doktoranta i współautorów.

#### **Drobne uwagi redakcyjne do całości pracy:**

w wielu miejscach są łączniki zamiast myślników; jest kilka zdań, które mogły by być lepiej zredagowane – np. str. 13, pierwsze zdanie akapitu pod tabelą 2. Podkreślić jednak należy, że ze skrótami myślowymi, czy niefortunnie zredagowane są nieliczne w pracy. Praca jest napisana poprawnym językiem, z prawidłową składnią.

Informacje zawarte w ostatnim zdaniu akapitu, zaczynającym się na str. 15., a kończącym się na str. 16. powinny być poparte odpowiednimi cytowaniami. Podobnie, informacje zawarte w zdaniu na str. 17, a dotyczące badań wykonanych na populacji krów rasy Brown Swiss.

**Wymienione powyżej uwagi nie umniejszają wartości naukowej pracy.**

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Łukasza Wodasa pt. „Ocena związku polimorfizmów genów kodujących białka serwatkowe mleka kłaczy (*LGB1*, *LGB2*, *LALBA*) z poziomem ich ekspresji” stanowi ważny wkład w badania nad składem mleka kłaczy oraz analizą molekularną genów białek mleka kłaczy. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż są to jedyne w Polsce i jedne z pierwszych badań na świecie dotyczące tych zagadnień. Prezentowana praca wskazuje na dobre przygotowanie teoretyczne Doktoranta, znajomość metod biologii molekularnej oraz narzędzi bioinformatycznych, umiejętność planowania i przeprowadzania badań naukowych, analizowania wyników i ich interpretacji oraz przygotowywania manuskryptów do publikacji. Należy podkreślić umiejętność aplikowania o środki finansowe na realizację badań.

**Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Zootechniki i Rybactwa Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr. inż. Łukasza Wodasa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, ze względu na nowatorską tematykę badawczą i wysoką wartość naukową niniejszej rozprawy, potwierdzoną opublikowaniem uzyskanych wyników w renomowanych czasopismach naukowych z listy JCR, **wniosuję o wyróżnienie ocenianej pracy.** Należy również podkreślić, że praca ma nie tylko poznawczy, ale i aplikacyjny charakter.

Jastrzębiec, 08.03.2021

