



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

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Mateusza Sypniewskiego  
pt.: „*Podstawy całogenomowej oceny ryzyka otyłości psa domowego (Canis lupus familiaris)*”

### Ogólna charakterystyka pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr inż. Mateusza Sypniewskiego została wykonana w Katedrze Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod opieką naukową Prof. dr hab. Macieja Szydłowskiego. Rozprawę doktorską stanowią dwie oryginalne prace naukowe napisane w języku angielskim. Jedna z prac została opublikowana w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports, którego wskaźnik impact factor (wg. danych zamieszczonych w dysertacji, zgodnie z rokiem publikacji) wynosi 2,518, a punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (podana również z uwzględnieniem daty publikacji) wynosi - 20 pkt (wykaz MNiSW 2023). Drugi artykuł naukowy ma formę manuskryptu, który według deklaracji autora został wysłany do czasopisma spełniającego wymogi Rady Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo UP w Poznaniu.

Artykuły/manuskrypty wchodzące w skład dysertacji:

1. Sypniewski, M.; Szydłowski, M. A Study of 41 canine orthologues of human genes involved in monogenic obesity reveals marker in the *ADCY3* for body weight in Labrador Retrievers. *Vet. Sci.* 2023, 10, 390. <https://doi.org/10.3390/vetsci10060390>  
2-letni IF`21 = 2.518 Punkty MEiN = 20  
Udział Doktoranta: 90%
2. Sypniewski M., Szydłowski M. Variants in *ADCY3* gene are associated with body condition score in Labrador Retrievers.  
Udział Doktoranta: 90%

W/w prace powstały w ramach finansowania przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki w konkursie OPUS 12 (pod kierownictwem Promotora rozprawy). Obie prace są współautorskie z udziałem jedynie promotora, a Doktorant jest w nich pierwszym autorem. Reaktywnie niska wartość punktowa opublikowanego artykułu, jest w mojej ocenie kompensowana przez zadowalający współczynnik wpływu. Swój udział w przygotowaniu publikacji Doktorant określił wysoko, na 90%, co zostało potwierdzone przez współautora w załączonych oświadczeniach. Udział Doktoranta w badaniach obejmował między innymi: opracowanie koncepcji badań, doboru metod analiz, wykonaniu analiz biostatystycznych, przygotowaniu manuskryptów oraz współredagowaniu powstałej publikacji. Prace stanowiące podstawę dysertacji zostały opatrzone obszernym opracowaniem w języku polskim, w którego skład wchodzi: wykaz skrótów, streszczenie (również w języku angielskim), wstęp, hipoteza i cel badań, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, wykaz cytowanej literatury, oświadczenia współautorów, dwie tabele oraz cztery ryciny. Opracowanie obejmuje także kopie opublikowanej pracy naukowej oraz manuskrypt anglojęzyczny, które są podstawą ocenianej rozprawy.

### **Sylwetka Doktoranta**

Jeżeli chodzi o sylwetkę samego Doktoranta, to przebieg jego edukacji i kariery naukowo-zawodowej dobrze rokuje w odniesieniu do przyszłej pracy naukowej. Tytuł magistra uzyskał 14-06-2014 w Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, po ukończeniu studiów na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii UP w Poznaniu. W późniejszych latach był zatrudniony w MNM Diagnostics, Centralnym Szpitalu Klinicznym MSWiA w Warszawie oraz w firmie Seargin (dla Roche), gdzie pracował jako bioinformatyk. Realizował także prace dla Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, głównie w ramach wspomnianego wcześniej Grantu OPUS12 2016/23/B/NZ2/01762. Praktykę dydaktyczną zdobył poprzez prowadzenie zajęć dla studentów, dotyczących analizy statystycznej, bioinformatyki oraz podstaw programowania w języku R. Doświadczenie zawodowe Doktoranta niewątpliwie dobrze przygotowało go do przeprowadzenia badań będących przedmiotem omawianej dysertacji. Kandydat nie ubiegał się uprzednio o nadanie stopnia naukowego doktora.

### **Ocena opracowania w języku polskim**

Opracowanie w języku polskim opisujące wyniki obu prac oryginalnych liczy łącznie 53 strony nie uwzględniając tekstów w języku angielskim oraz oświadczeń Współautora. Spis literatury obejmuje 104 pozycje, z których większość została opublikowana po roku 2010, więc jest względnie aktualna.

Opracowanie zostało opatrzone tytułem spinającym tematykę badawczą obu prac, tj.: „Podstawy całogenomowej oceny ryzyka otyłości psa domowego (*Canis lupus familiaris*)”. Pomimo, że tytuł ten

ogólnie odpowiada tematyce opisywanych badań, to mógł zostać lepiej doprecyzowany i wskazać, że analiza dotyczyła raczej szeregu genów kandydujących, niż całego genomu. Jednostronicowe streszczenie pracy dobrze opisuje całość przeprowadzonych badań, jednak w opisie metodyki brakuje pewnych ważnych informacji, dotyczących np. sposobu oznaczenia genotypów analizowanych markerów czy przyczyn redukcji liczby markerów w analizach z wykorzystaniem wskaźnika *body condition score* (BCS).

We wstępnej części opracowania Autor definiuje pojęcie otyłości i wskazuje, że jest ona poważnym problemem zdrowotnym u różnych ras i populacji psów w Polsce i na świecie. W dalszej części omawia znane miary otyłości psa, skupiając się przede wszystkim na wykorzystanym w badaniach wskaźniku BCS. Szkoda, że w tym miejscu pracy Autor nie odniósł się krytycznie do masy ciała jako miary otyłości, co rozwiałyby późniejsze wątpliwości recenzenta. Następnie Autor przechodzi do opisu czynników ryzyka otyłości, które dzieli na pozagenetyczne (w domniemaniu środowiskowe) i genetyczne. Pośród najważniejszych czynników pozagenetycznych, Autor prawidłowo identyfikuje złe żywienie i brak ruchu. Jako pozostałe czynniki ryzyka Autor wskazuje więzi emocjonalne pomiędzy psem i człowiekiem, wiek właścicieli oraz wiek psa. Pośród czynników pozagenetycznych otyłości Autor wymienia także płęć psa, jednak sugerowałbym przeniesienie tego fragmentu do opisu czynników genetycznych. Wśród czynników genetycznych otyłości psów Autor zwrócił uwagę na rasę i wskazał rasy szczególnie narażone na wystąpienie otyłości, jednak ze względu na małą liczbę dostępnych źródeł literaturowych, dalszą część tego podrozdziału oparł o wyniki badań prowadzonych na ludziach, bądź innych gatunkach modelowych. W opisie tym Autor zawarł charakterystykę współczynnika odziedziczalności otyłości, który kształtuje się u różnych gatunków na poziomie od 40 do 70%. Ten wysoki udział komponentu genetycznego w pełni uzasadnia poszukiwanie podłoża genetycznego tej cechy, nawet w oparciu o mało liczne próby populacyjne. W dalszej części opisu Autor wyróżnił dwa modele genetycznego warunkowania otyłości, a mianowicie: predyspozycje genetyczne o charakterze poligenów oraz dziedziczne wady genetyczne będące przyczyną wystąpienia otyłości. W końcowym fragmencie tego podrozdziału Autor stwierdza, że zarówno poligeny jak i mutacje o dużym efekcie mogą być podłożem genetycznym poszczególnych przypadków otyłości. Wydaje mi się, że opis ten powinien zostać uzupełniony o obraz otyłości jako cechy ilościowej o podłożu wielogenowym. Cechy takie są często warunkowane przez tzw. geny główne o dużym efekcie oraz szereg innych genów/wariantów o pomniejszych efektach addytywnych. Kolejny rozdział dysertacji szczegółowo omawia problem otyłości monogenicznej warunkowanej przez mutacje genetyczne. Opisuje także wyniki badań prowadzonych z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji, w których zidentyfikowano mutacje w genach semaforyn klasy 3, jako pośredniego regulatora syntezy proopiomelanokortyny. Kolejny podrozdział dotyczy otyłości jako cechy ilościowej, do analizy której autorzy wykorzystali indeks masy ciała (BMI),

jako wystandaryzowaną miarę, dobrze korelującą z poziomem tkanki tłuszczowej w organizmie. Wczesne badania z tego zakresu prowadzone w oparciu o typowanie genów kandydujących zaowocowały wykryciem efektów polimorfizmów w 6 różnych genach powiązanych z wystąpieniem otyłości u ludzi. Dalsze badania prowadzone z wykorzystaniem techniki GWAS zidentyfikowały setki *loci* genomu zasocjowanych z otyłością. Sporo miejsca Autor poświęca na opis badań prowadzonych w populacjach izolowanych lub założycielskich stanowiących dobry model do badań otyłości oraz badaniom wykorzystującym różne techniki sekwencjonowania genomowego oraz różne typy markerów genetycznych. Rozdział ten Autor kończy przeglądem czynników środowiskowych, które mogą zaburzać wyniki analiz asocjacyjnych, i które powinny zostać uwzględnione przy konstruowaniu modelu statystycznego. W kolejnym podrozdziale Autor po krótko wspomina o czynnikach epigenetycznych (głównie metylacji DNA) jako istotnym elemencie mechanizmu powstawania otyłości.

W końcowej części wstępu Autor powraca do badań genetycznych prowadzonych w aspekcie otyłości u psów, spinając tym samym klamrom cały wstęp. W opisie tym Autor wykazuje na 14-nuleotydomą insercję/delicję w genie *POMC* jako najlepiej udokumentowany polimorfizm o dużym wpływie na powstawanie otyłości u psów. Podejmuje się także porównania nasilenia objawów otyłości u psów i człowieka w wyniku wystąpienia predysponujących alleli w genie *POMC*. W ojej ocenie fragment ten powinien zostać usunięty, gdyż bez porównania charakteru polimorfizmów oraz ich wpływu na strukturę i funkcje kodowanego białka oraz ich efektów metabolicznych nie ma on merytorycznego uzasadnienia.

Tę część dysertacji oceniam pozytywnie i uważam, że w sposób wystarczający (choć może niewyczerpujący) nakreśla ona problem badawczy, jego istotność oraz prezentuje dotychczasowe wyniki badań przerodzonych w tym zakresie. Zawarte w końcowym opisie uzasadnienie wyboru przedmiotu badań uznaję za wystarczające, a sam przedmiot badań za ciekawy i wartościowy. Brak dużej liczby badań dotyczących genetycznych aspektów otyłości psów dobrze świadczy o innowacyjnym charakterze przeprowadzonych badań. We wstępie Autor nie ustrzegł się jednak drobnych błędów stylistycznych i merytorycznych, do których odniosę się w końcowej części oceny opracowania.

Po wstępnym rozdziale pracy Autor zamieścił opis hipotezy i celu prowadzonych badań. W mojej ocenie opis ten jest nieco zbyt rozbudowany i niepotrzebnie odnosi się do otyłości człowieka, która nie jest przedmiotem badań ocenianej dysertacji. Hipoteza i cele badań powinny zostać sformułowane zwięźle i precyzyjnie. Jest to jednak tylko kwestia kosmetyczna, gdyż samą postawioną hipotezę uważam za właściwą a nakreślone cele badań za ciekawe i aktualne. Moją uwagę zwrócił natomiast brak odniesienia się we wstępie i celu badań do zawężenia informacji genetycznej jedynie do 41 ortologów powiązanych we wcześniejszych badaniach w otyłością u ludzi. Takie zawężenie informacji genetycznej w zasadzie zamyka drogę do wykrycia genów z efektami charakterystycznymi jedynie dla psów. Przyczyny takiego podejścia metodycznego na tym etapie pracy są niejasne i trudne do uzasadnienia,

skoro z wykorzystaniem sekwencjonowania genomowego Autor mógł przedstawić analizę polimorfizmu wszystkich egzonów adnotowanych w genomie referencyjnym psa.

Materiał badawczy obejmował 50 psów rasy labrador retriever w wieku od 12 do 120 miesięcy, dla których określono macę ciała, wskaźnik BCS oraz pobrano próby materiału biologicznego i przeprowadzono sekwencjonowanie genomowe w toku innych, wcześniejszych badań. Autor deklaruje, że wartości dla stosunku płci i wieku były podobne w grupach badawczych, nie jest to jednak poparte odpowiednim opracowaniem statycznym. Dla badanych prów pobrano dane dotyczące sekwencji genomu z publicznej bazy danych, jednak Autor nie informuje o tym jakie to były dokładnie dane (surowe sekwencje, pliki mapowania, czy pliki z wariatami) i w jakiej publikacji zostały wcześniej opisane. Informacje te znajdują się jednak w odpowiednim miejscu oryginalnych opracowań anglojęzycznych. W tym miejscu dysertacji, dla klarowności przekazu, wskazany byłby chociaż krótki opis przygotowania bibliotek, sekwencjonowania, filtrowania odczytów, mapowania do genomu, identyfikacji polimorfizmów oraz ich filtrowania, z którymi to etapami analiz recenzent mógłby się zapoznać bez sięgania do wcześniejszych publikacji. Nie jest także jasne czy panel genów zaczerpnięty z produktu firmy Blueprint Genetics jest kompletny i aktualny.

W dalszym opisie metodyki Autor zwiera informację na temat wybranych modeli statystycznych. Badania asocjacyjne wykorzystujące masę ciała jako zmienną niezależną zostały przeprowadzone z wykorzystaniem mieszanego modelu liniowego, w którym uwzględniono stratyfikację populacji (poprzez włącznie do modelu macierzy wariancji-kowariancji) oraz takie efekty jak płeć, wiek oraz przeprowadzenie zabiegu kastracji. Poprawkę na wielokrotne testowanie przeprowadzono z wykorzystaniem wyrafinowanej metody *family-wise error rate* (FWER). Nie mam zastrzeżeń do zastosowanego podejścia statystycznego, w opisie brakuje jednak szczegółowej informacji na temat wykorzystanego oprogramowania oraz jego wersji. W przypadku badania z wykorzystaniem BSC zastosowano podejście typu *case-control*, alokując osobniki do dwóch kategorii zwierząt: otyłych i kontrolnych. Podejście to dobrze uzasadniono w późniejszej dyskusji. Przed właściwą analizą statystyczną zastosowano tzw. LD-pruning, którego nie użyto z nieznanymi powodów w analizach z wykorzystaniem masy ciała. Do oceny wpływu badanych wariantów na przyjęty fenotyp wykorzystano regresję logistyczną i model addytywny, uwzględniający takie czynniki jak wiek, płeć i sterylizację. W wariancie modelu uwzględniono także efekt genu *POMC*, aby uwidocznic inne, pomniejsze efekty. Do tej części analiz również nie mam zastrzeżeń merytorycznych. Do oceny wiarygodności wyników wykorzystano wykresy typu Q-Q, które jednak nie zostały wygenerowane dla wcześniejszych analiz wykorzystujących masę ciała psów.

W rozdziale wyniki, Autor w skrótowy i przystępny sposób opisał główne rezultaty obu analiz. W przypadku analizy masy ciała zidentyfikowano jeden wariant istotnie zasocjowany z masą ciała w

genie *ADCY3* oraz zaobserwowano trend statystyczny w kierunku asocjacji innego markera zlokalizowanego w genie *RYR3*. Nie zaobserwowano natomiast istotności dla delecji w genem *POMC* o wcześniej opisanym związku z masą ciała u psów. Jako drobne uchybienia wskazałbym tu brak charakterystyki i statystyk polimorfizmu panelu markerów użytego do analiz, co uniemożliwia jego ocenę pod kątem jakości i przydatności do tego typu badań.

W opisie wyników uzyskanych na podstawie analizy wskaźnika BCS, Autor szerzej omówił panel użytych markerów oraz wskazał dwa w pełni ze sobą sprzężone markery w genie *ADCY3* jako zasocjowane z otyłością u badanej rasy psów. Wnioskuje, że LD pruning nie usunął jednego z tych markerów z powodu dużej ilości wariantów w regionie genomu dzielącym te dwa markery. Oba markery charakteryzowały się wysokim ilorazem szans, sugerującym duży efekt na analizowaną cechę. Oba polimorfizmy były wariantami intronowymi. Uwzględnienie lub nie efektu insercji/delecji 14pz w genie *POMC*, jako genu głównego w modelu statystycznym, nie wpłynęło znacząco na istotność wyników otrzymanych dla polimorfizmów genu *ADCY3*. Opis wyników analiz z wykorzystaniem BCS jest poprawny i w sposób wyczerpujący opisuje zidentyfikowane zależności pomiędzy polimorfizmami a badaną cechą.

W mojej ocenie, dyskusja jest najlepiej opracowaną częścią ocenianej pracy. W początkowych opisach tego rozdziału Autor przedstawia predyspozycje rasy labrador retriever do otyłości, poligenowy charakter otyłości oraz odnosi się do badań genetycznych przeprowadzonych u innych ras psów. W dalszej części krytycznie odnosi się do miar otyłości stosowanych u psów i szeroko uzasadnia konieczność wykorzystania masy ciała w badaniach własnych, pomimo jej niedoskonałości w ocenie otyłości u psów. Uzasadnienie to uznaję za przekonujące i odpowiednio argumentuje użycie masy ciała do analiz asocjacyjnych, szczególnie gdy zastosowany model statystyczny uwzględnia płeć, wiek i sterylizację badanych osobników. Autor odnosi się także do przyczyn zastosowania podejścia typu case-control w analizach wskaźnika BCS, uzasadniając, że jest on miarą porządkową o jedynie trzech wartościach w analizowanej populacji, co wymusza zostawanie osobnego podejścia statystycznego. Wyrażanie tej zmiennej na skali dychotomicznej jest jednym z rozwiązań, które w mojej ocenie jest dopuszczalne, a więc prawidłowe. W dalszej części Autor podkreśla zalety wykorzystania tylko jednej rasy do analiz oraz uwzględnienia poprawki na ukryte struktury populacji dzięki zastosowaniu mieszanego modelu liniowego. Wyjaśnienia odnośnie niewykorzystania poprawki na strukturę populacji w banii BSC są dla mnie mniej przekonujące, gdyż uwzględnienie w regresji logistycznej dwóch pierwszych komponentów zmienności metody PCA jest możliwe. Niemniej jednak, zwiększanie liczby efektów w modelu może prowadzić do obniżenia mocy statystycznej testu i finalnie braku istotności statystycznej.

Dalej Autor uzasadnia zawężenie przeprowadzanych analiz do 41 genów powiązanych z otyłością monogeniczną u ludzi. Za główny argument podaje, że mechanizmy powstawania otyłości są podobne u różnych gatunków, a więc w domyśle są warunkowane przez te same geny. Stwierdzenie to może, lecz nie musi być prawdziwe, i tak jak wspomniałem wcześniej, chętnie zobaczyłbym wyniki z analiz asocjacyjnych dla wszystkich znanych genów psa.

W dalszej części dyskusji Autor przechodzi do opisu funkcji i znaczenia genów *ADCY3* i *POMC* dla fizjologii organizmu i powstawania otyłości. Ta część opracowana jest bardzo dobrze i szczegółowo, a zamieszczone analizy w dużym stopniu uwiarygadniają polimorfizm genu *ADCY3* jako modulator masy ciała i otyłości psów rasy labrador.

Praca kończy się kilkoma wnioskami odnoszącymi się do postawionej hipotezy i celów badań. Ponownie, odniesienie do dziedziczenia otyłości u ludzi uznaję za niepotrzebne i niewynikające z przeprowadzonych badań, szczególnie gdy Autor wykorzystał geny odpowiedzialne za otyłość monogeniczną u ludzi a badał otyłość powszechną o przewidywanie poligenowym charakterze u psów. Pozostałe dwa wnioski uważam za prawidłowe i dobrze odzwierciedlające wyniki przeprowadzonych badań.

Z obowiązku recenzenta odniosę się także do pomniejszych błędów i niedociągnięć znalezionych w pracy. Praca zyskałaby dzięki ponumerowaniu poszczególnych podrozdziałów oraz wprowadzaniu podrozdziałów także w dyskusji. Kilka stwierdzeń we wstępie i dyskusji wymaga referencji, ponieważ wynika z badań innych autorów. Tekst zawiera także pewną liczbę nieporwanych lub „niezręcznych” określeń jak np.: „ciężsi na jedną kopię allelu”, „ p-wartość”, „14 pz delecja *POMC*”, „częstość mniejszego allelu”, czy nadużywanie określenia „mutacja” w stosunku do „polimorfizmu” itp. Nie jest ich jednak wiele i nie wpływają na ogólny odbiór i poprawność stylistyczną pracy.

### **Ocena opracowań anglojęzycznych**

W odniesieniu do anglojęzycznych opracowań w formie publikacji oraz manuskryptu, stwierdzam, że zawierają one opisy tożsame z ocenianą dysertacją polskojęzyczną, a w pewnych miejscach (z wyjątkiem dyskusji i wstępu) nawet bardziej szczegółowe. Obie prace oceniam pod względem merytorycznym oraz pod względem oryginalności i zasadności podjętych badań wysoko, a sam sposób opisu i konstrukcje prac oceniam bardzo dobrze. Obie prace stanowią ważny wkład do dorobku dyscypliny. Jakość przeprowadzonych analiz i ich opis z pewnością świadczą o dobrym przygotowaniu Doktoranta do dalszej pracy naukowej.

## Podsumowanie

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. Opis jest czytelny, przejrzysty, jasny dla czytelnika, a język opracowania jest więcej niż poprawny i wystarczająco ścisły. Wartość merytoryczną opisanych badań oceniam wysoko i są one w mojej ocenie przeprowadzone prawidłowo, z widoczną znajomością tematu. Pomimo, że układ analiz statystycznych zdradza dążenie do uzyskania statystycznie istotnych wyników, to są one w mojej ocenie przeprowadzane poprawnie i zgodnie z przyjętymi standardami. Na uwagę zasługuje duży wkład indywidualny Doktoranta, określony na 90%, co świadczy o jego dużej samodzielności, znajomości metod statycznych i zdolności wykorzystania zaawansowanych programów obliczeniowych.

## Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca pt.: „Podstawy całogenomowej oceny ryzyka otyłości psa domowego (*Canis lupus familiaris*)”, pomimo swojego nietypowego, hybrydowego charakteru, 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 Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr inż. Mateusza Sypniewskiego do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.

20.12.2023



UNIWERSYTET ROLNICZY  
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie  
OŚRODEK MEDYCYNY  
EKSPERYMENTALNEJ I INNOWACYJNEJ  
50-248 Kraków, ul. Rędzina 1 C  
tel. +4812 431 6648, e-mail: omeii@urk.edu.pl  
adres do korespondencji: 31-120 Kraków, al. Mickiewicza 21