

Bydgoszcz, dnia 12.07.2022

dr hab. inż. Beata Anna Sitkowska, prof. PBS
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Woźniak

pt. „Analiza strukturalna genu HK2 w aspekcie cech użytkowych świń oraz parametrów jakości mięsa wieprzowego”

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Woźniak została wykonana na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, w Katedrze Genetyki Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, pod kierunkiem promotora Pana dr hab. inż. Arkadiusza Termana, prof. ZUT oraz promotora pomocniczego Pani dr hab. inż. Katarzyny Ropki-Molik, prof. IZ z Instytutu Zootechniki, Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach.

Podstawą formalną wykonania przeze mnie recenzji jest uchwała Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 2 czerwca 2022 roku.

Rozprawa doktorska napisana jest w formie jednolitej monografii. Przy ocenie rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Woźniak uwzględniono zasadność podjęcia tematu, w dalszej kolejności jakość formalną, metodologiczną oraz merytoryczną pracy. Ocenie poddano problem badawczy, układ pracy, cel i zaproponowaną hipotezę, przyjętą metodykę badań oraz ujęcie problemu badawczego i jego prezentację. W recenzji przedstawiono również moje uwagi oraz sugestie, które umieściłam przy ocenie każdej części pracy.

Przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr Katarzyny Woźniak napisana jest w języku polskim, jest rozprawą liczącą 99 stron. Układ pracy oraz podział treści jest raczej tradycyjny i z formalnego punktu widzenia nie budzi zastrzeżeń. Praca zawiera kolejno: *Spis treści* (strony 3-4), *Wykaz skrótów* (strony 5-8), *Wstęp* (strona 9), *Przegląd literatury* (strony 10-25), *Cel pracy* (strona 26), *Material i metody* (strony 27-42), *Wyniki* (strony 43-63), *Dyskusję* (strony 64-70), *Podsumowanie i wnioski* (strona 71), *Streszczenie* (strony 72-73), *Abstract* (strony 74-75), *Suplement* (strony 76-83), *Spis tabel* (strony 84-85), *Spis rycin* (strony 86-87), *Bibliografię* (strony 88-99). Rozprawa zawiera 106 pozycji literatury, 29 tabel oraz 20 rycin. Szata graficzna nie budzi zastrzeżeń.

Ocena merytoryczna pracy

Oryginalność i zasadność podjętego tematu

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Woźniak wpisuje się w obszar dyscypliny zootechnika i rybactwo. Podjęte badania dotyczą ważnego dla hodowców trzody chlewnej oraz konsumentów aspektu – cech użytkowych świń oraz parametrów jakości mięsa.

Podjęte przez Doktorantkę badania uważam za aktualne i uzasadnione z naukowego punktu widzenia.

Uzasadnienie badań

Uzasadnienie podjętych badań przedstawiono w rozdziałach Wstęp oraz Przegląd piśmiennictwa. Liczą one 16 stron, z czego Przegląd literatury podzielony został na 4 podrozdziały, z których 1 zawiera jeszcze 5 podrozdziałów. W rozdziale tym Autorka wprowadza czytelnika w tematykę badawczą, omawia zagadnienia związane z jakością mięsa, z procesem glikolizy, przystępnie opisuje kluczowy w badaniach enzym heksokinaze oraz gen *HK2*. Całość poparta jest prawidłowo dobranymi pozycjami piśmiennictwa, co dowodzi znajomości zagadnienia przez Autorkę. Do tej części pracy mam kilka drobnych uwag, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, ale ich uwzględnienie może poprawić czytelność dysertacji:

-- Doktorantka w pierwszym akapicie przeglądu literatury powołuje się na normy ISO, może warto dodać ich pełne nazwy w spisie piśmiennictwa;

- Przed oddaniem pracy do druku w czasopiśmie naukowym warto przereklamować bądź skrócić niektóre zdania, które w obecnej formie są trudne do zrozumienia, np. na stronie 17: „pH 45 minut po uboju w mięśniu najdłuższym grzbietu pomiar wykonywany jest między ostatnim kręgiem piersiowym i pierwszym kręgiem lędźwiowym po odsłonięciu warstwy tłuszczu podskórnego i dokonaniu nacięcia mięśnia na głębokość około 2 cm w głąb i całkowitym wbiciu

elektrody szklanej w miejscu nacięcia.”. Zdania na stronie 17: „Gen *RYR1* zbudowany jest z 28080 par zasad i został zmapowany w chromosomie 6p11-6q21.”;

- Na stronie 19 pojawia się niezrozumiały zapis (EC 2.7.1.1), „Pierwszy etap glikolizy katalizowany jest przez enzym heksokinazę (EC 2.7.1.1), która fosforyluje glukozę do glukozo-6-fosforanu.”;

- W odwołaniu do Ryciny 5 wskazano źródło pochodzące ze strony NCBI, sugeruję dodać link do konkretnej strony w spisie piśmiennictwa;

- Na stronie 24 proszę o sprawdzenie podanego numeru *HK2* (ENSSSCG00000008261), wydaje mi się, że powinno być: ENSSSCG00055013579 oraz numeru wariantu HK2-202 powinien być: ENSSSCT00055026781.1, natomiast jest: ENSSSCG00055013579.1. *HK2* ENSSSCG00055013579 ma 2 warianty splicingowe, natomiast ENSSSCG00000008261 tylko jeden. Może warto również zaznaczyć z jakiej bazy pochodzą te oznaczenia i podać odwołanie do strony ENSEMBL;

- Na stronie 25 sugeruję przeredagować zdanie: „Transkrypcja genu *HK2* może być regulowana insuliną; a mianowicie wykazano, że insulina podnosi ekspresję tego genu (Tan i Miyamoto 2015, Jun i in. 2006, Jun i in. 2012).”

Cel badań

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła cel i hipotezę badawczą. Określono cel pracy: „Celem niniejszych badań była detekcja polimorfizmów w genie kodującym heksokinazę 2 (*HK2*) u świni domowej (*Sus scrofa domestica*) oraz ustalenie potencjalnych zależności pomiędzy genotypami analizowanych fragmentów genu a cechami użytkowymi świń (tucznymi i rzeźnymi) oraz wybranymi parametrami jakości mięsa.”

Hipoteza badawcza pracy sformułowana została rzeczowo i zwięźle: „W sekwencji genu kodującego heksokinazę 2 występują zamiany polimorficzne, które w istotny sposób mogą wpłynąć na cechy fenotypowe badanych osobników.”

- Sugeruję przeredagować hipotezę badawczą, moim zdaniem w obecnej formie jest ona zbyt ogólna (warto wyjaśnić jakie „zamiany” autorka ma na myśli oraz jakich cech fenotypowych dotyczy badanie).

Metodyka badań

Dla zrealizowania założeń rozprawy doktorskiej wykorzystano materiał badawczy (nazwany doświadczalnym) pochodzący od 722 loszek należących do trzech ras. Rozdział ten

zredagowano z dbałością o poprawność językową oraz szczegóły przeprowadzonych analiz molekularnych, co oceniam bardzo wysoko i gratuluję pracy włożonej w tak przemyślaną analizę.

W rozdziale Materiał i metody brakuje mi kilku istotnych informacji:

- W jakich latach prowadzone były badania? Gdzie wykonywane były analizy molekularne?

- Odwołanie do Ryciny 7 na stronie 30, w obecnej formie brzmi: „Analiza asocjacji zidentyfikowanych polimorfizmów w genie *HK2* obejmowała następujące cechy (Rycina 7):” moim zdaniem należy te cechy krótko opisać w tekście, podobna uwaga odnosi się do innych opisów umieszczonych w dysertacji;

- Na stronie 31 pod koniec 3 akapitu „wodochłonność (zgodnie z metodyką Grausa-Hamma) – zabrakło roku publikacji, na którą powołuje się doktorantka;

- Sugeruję wyróżnić osobnym podrozdziałem analizy genetyczne, przed podrozdziałem 4.2. Izolacja genomowego DNA (strona 31);

- Na stronie 32 znajduje się zdanie: „Sekwencje nukleotydowe użytych starterów, temperatury ich przyłączenia oraz długości otrzymanych produktów PCR zamieszczono w Tabeli 5.” Moim zdaniem chodziło o tabelę 8;

- Kolejna uwaga dotycząca odwołania do tabel na stronie 37, cytuję: „Do amplifikacji poszczególnych fragmentów genu użyto starterów flankujących fragmenty genu przedstawione w Tabeli 3. Do uzyskania powyższych amplikonów wykorzystano polimerazę AmpliTaq® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems, Polska). Skład oraz przebieg reakcji przedstawiono w Tabeli 4 oraz Tabeli 5.” Tabela 3 zawiera skład poszczególnych pasz zastosowanych w żywieniu świń, Tabela 4 przedstawia parametry pokarmowe pasz;

- Na stronie 39 w Tabeli 12 przy eksonie 7 genu *HK2* nie podano sekwencji starterów, a tylko ich umowne oznaczenia: F1 i R1;

- Analiza statystyczna – strona 42 – nie wspomniano, że szacowano miary położenia i zmienności, a przedstawiono je w tabelach 21-23;

- Co zostało uwzględnione w modelu statystycznym rok czy dzień uboju? W metodyce podany jest rok, w tabelach dzień. W modelu statystycznym brakuje poziomów uwzględnionych czynników.

Wyniki i Dyskusja

Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione i udokumentowane w formie tabel oraz rycin, opis wyników zaprezentowano na 20 stronach, a dyskusja została przedstawiona na 6 stronach.

Uwagi dotyczące wyników:

- W tabelach 16, 17 i 18 autorka drugą kolumnę nazwała „Nazwa mutacji”, ponieważ zawiera ona kilka informacji proponuję zmienić jej nazwę;

- W tabelach 19-20 przedstawiono frekwencje genotypów oraz alleli analizowanych polimorfizmów. Dlaczego nazwa PUŁAWSKA zapisana jest z wielkich liter? Dlaczego ostatni wiersz nazwany został SUMA, proszę o doprecyzowanie.

- Moje wątpliwości dotyczą również tabel od 21 do 28, ponieważ ich układ jest podobny uwagi przedstawiam zbiorczo:

- Powtarzają się sformułowania „Istotności GLM”, moim zdaniem nie jest to właściwa forma;

- Proszę sprawdzić czy oznaczenia istotności oraz przypisy pod tabelami są prawidłowe;

- Wykazane istotności w poziomie cech w przypadku rasy puławskiej prawdopodobnie mogą zostać wyjaśnione przez frekwencję poszczególnych genotypów. W grupach zwierząt ras wbp oraz pbz zdecydowanie dominował tylko jeden wariant allelu;

- W tabelach 21-23 zapis „istotności GLM” jest identyczny jak w tabelach 24-28, uważam że można go pominąć, lub dla lepszej interpretacji zastąpić podając wartości współczynnika p ;

- Czy w tabelach 21-23 „Dane przedstawiono w postaci średnich LSM”? Tak sugeruje podpis pod tabelami, jednak w nagłówku tabeli wpisana jest średnia, a dalej odchylenie standardowe i współczynnik zmienności;

- W niektórych przypadkach moje wątpliwości budzi sposób odniesienia do wyników prezentowanych w tabelach, np. na stronie 34, powinno zostać zmodyfikowane zdanie: „Profil termiczny reakcji przedstawiał się następująco (Tabela 7):”.

Dyskusja zaprezentowana w recenzowanej przeze mnie rozprawie jest merytoryczna, krótko przeprowadzona i udokumentowana cytowanymi źródłami.

Na podkreślenie zasługuje umiejętność Autorki w przeprowadzeniu opisanych badań laboratoryjnych. Jak podkreśla doktorantka „opracowane metody detekcji polimorfizmów genu HK2 mogą stanowić szybki i tani test diagnostyczny pod kątem opracowanych markerów.”. Szkoda, że doktorantka nie pokusiła się o przedstawienie wyceny tego typu analiz, prawdopodobnie spowodowane było to zmianami cen na rynkach.

Autorka sformułowała 6 wniosków końcowych, ich treść jest uzasadniona.

Spis literatury zawarty został na 11 stronach. Analiza bibliografii zawarta w pracy została oparta na 106 pozycjach literatury, pochodzących w większości z czasopism o zasięgu

międzynarodowym, przy czym należy podkreślić wartość zacytowanych prac. Prace pochodzą z lat 1951– 2021. Uwagi edytorskie dotyczące spisu piśmiennictwa:

- W bibliografii występują dwie pozycje autorstwa Tyra i Żak z 2012 roku, sugeruję wprowadzić dodatkowe oznaczenia przy roku np. a i b;
- Na stronie 13 – przy pozycji literatury Wood 2008, powinno być Wood i in. 2008;
- Pozycja 66 dwaj autorzy: Parra i Petle, 1995, natomiast w tekście na stronach 20 i 21 praca cytowana jest jako Parra i in. 1995, proszę o doprecyzowanie;
- Nie znalazłam cytowania w tekście: pozycja 7– Blicharski i in. 2015, pozycja 20 – Forlemu i in. 2007, pozycja 64 – O’Neill i in.;
- W bibliografii pozycja 67 – PIC, USA, 2020 –w tekście cytowana jako PIC, 2020 – proszę ujednoczyć zapis;
- W bibliografii brak pozycji, do której odnosi się Autorka na stronach 31 (Reed i in. 2007) oraz 32 (Żebrowska i in. 2011).

Dodatkowo nasuwa mi się jeszcze uwaga dotycząca stosowanych w dysertacji skrótów, jest to bardzo cenne, ponieważ pozwala, podczas czytania i analizy tekstu, w każdym momencie wrócić do tej części. Moje wątpliwości budzi: dlaczego skróty i ich wyjaśnienia są powtórzone w tekście? Moim zdaniem nie jest to już konieczne. Dodatkowo w tekście pojawiają się skróty, które nie zostały umieszczone w spisie, np. na stronie 12 „FA” czy na stronie 16: „AM (tzw. mięso kwaśne)”. Część skrótów ma również inne wytłumaczenie w tekście a inne w spisie, np. w tabeli 1 na stronie 16: Typ mięsa – Normalne (RFN), podczas gdy w wykazie skrótów „mięso odpowiedniej jakości”. Zdarzają się również skróty bez wyjaśnienia, np. na stronie 23 „VDAC”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera również streszczenia w języku polskim i angielskim, które zostały podzielone zgodnie z podziałem rozdziałów pracy. Autorka przedstawiła w nich najważniejsze fakty merytoryczne oraz najważniejsze osiągnięcia poznawcze uzyskane w prowadzonych analizach.

Z obowiązku recenzenta chciałam zwrócić uwagę, że zarówno w rozdziale *Materiał i metody* oraz w *Streszczeniach* warto w przypadku odwołania do programu SAS powołać się na pozycję literatury. W *Streszczeniach* jest zapis: „Analiza statystyczna przeprowadzona została przy użyciu pakietu SAS/STAT” natomiast w rozdziale *Materiał i metody* „Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu SAS v. 8.02...”. Odwołanie do literatury pozwoli na ujednoczenie stosowanej nomenklatury.

Przedstawione przeze mnie uwag i sugestii, które nasunęły się po przeczytaniu dysertacji, dotyczą głównie aspektów techniczno-redakcyjnych i nie wpływają na wartość merytoryczną

recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej. Uwagi mogą zostać uwzględnione przez Doktorantkę podczas przygotowywania prezentowanych wyników badań do druku.

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi i spostrzeżenia mają charakter głównie redakcyjny i w żaden sposób nie wpływają na jednoznacznie pozytywną ocenę dysertacji. W mojej opinii uzyskane wyniki badań stanowią spójne i kompleksowe opracowanie podjętego problemu badawczego. Wyciągnięte wnioski stanowią podstawę do dalszych badań w tym zakresie, być może prowadzonych na większej populacji zwierząt. Niniejszą pracę oceniam bardzo wysoko pod względem merytorycznym, głównie zaprezentowanego warsztatu z zakresu badań i analiz molekularnych.

Wniosek końcowy:

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny dysertacja Pani mgr Katarzyny Woźniak „Analiza strukturalna genu HK2 w aspekcie cech użytkowych świń oraz parametrów jakości mięsa wieprzowego” stanowi bardzo wartościowe opracowanie problemu naukowego i tym samym w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. z dnia 14 marca.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) oraz ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z tym przedkładam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Woźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. inż. Beata Anna Sitkowska, prof. PBŚ