

Olsztyn 12.09.2022 r.

dr hab. Agata Banczerz-Kisiel, prof. UWM
Katedra Epizootiologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Pawła Wojtaszczyka pt. „**Badania nad określeniem poziomu zróżnicowania ekspresji genu *Foxp3* u lisa pospolitego *Vulpes vulpes* oraz ocena zróżnicowania poziomu jego ekspresji w porównaniu do psa domowego *Canis familiaris* w świetle funkcji czynników transkrypcyjnych forkhead box**”, wykonanej pod kierunkiem promotora: prof. dr hab. Łukasza Adaszka w Katedrze Epizootiologii i Klinice Chorób Zakaźnych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Podstawa formalna recenzji

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 7 lipca 2022 roku.

Oryginalność, aktualność i przydatność podjętego problemu naukowego

Doktorant podjął badania nad kompleksem transkrypcyjnym forkhead box, którego ekspresja wiąże się z ważnymi procesami fizjologicznymi, zachodzącymi na poziomie różnych obszarów funkcjonalnych. Próbki pozyskano od niebadanych dotychczas lisów pospolitych oraz od psów domowych, stanowiących niejako grupę odniesienia. Podjęte badania oceniam jako oryginalne i aktualne, choć ich potencjał wdrożeniowy wzrósłby znacząco, gdyby Doktorant spróbował ocenić jak wykazane poziomy ekspresji badanych genów przekładają się na funkcjonowanie organizmu zwierząt, od których pobierano próbki do badań. To zresztą sugeruje tytuł, w którym znajduje się stwierdzenie, że ocena poziomu ekspresji genu *foxp3* dokonywana była w świetle funkcji czynników transkrypcyjnych forkhead box. Tytuł nie do końca zatem odpowiada zakresowi przeprowadzonych badań.

Ogólna charakterystyka przedstawionego do recenzji manuskryptu

Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji ma formę monografii, o układzie redakcyjnym odpowiadającym wymogom stawianym pracom naukowym. Liczy 118 stron wydruku komputerowego, obejmującego 1 stronę spisu treści, 4 strony streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, 19 stron wstępu, 1 stronę celów badań, 15 stron materiałów i metod, 49 stron wyników, 16 stron dyskusji i wniosków oraz 11 stron piśmiennictwa. Niezwykle bogata dokumentacja obejmuje 87 rycin i 8 tabel, umiejętnie włączonych w tekst pracy.

Ocena przedstawionego do recenzji manuskryptu

We Wstępie Doktorant opisuje istotę badania poziomu ekspresji genów, omawia kompleks transkrypcyjny forkhead box, geny *foxp3* i *hprt* oraz genetyczne podstawy charakterystyki gatunkowej psów domowych i lisów pospolitych. W mojej ocenie jest to dobra analiza zgromadzonego piśmiennictwa, poświęconego omawianym zagadnieniom, choć nieco chaotyczna. Podrozdział 3.3. powinien być dodatkowo podzielony, aby być bardziej czytelny, przydałby się także schemat opracowany przez Doktoranta, uwidaczniający wpływ *foxp3* (nazwy genów powinny być pisane kursywą) na fizjologiczne i patologiczne stany u zwierząt i ludzi. Wpływ poziomu ekspresji *foxp3* na występowanie spontanicznych poronień u kobiet omawiany jest np. na str. 15, potem następuje omówienie podwyższonego poziomu ekspresji Treg CD4+CD25+Foxp3 u psów z atopowym zapaleniem skóry, po czym Autor znów wraca do układu rozrodczego, tym razem do niepowodzeń poczęć u bydła. Wstęp zyskałby na przejrzystości, gdyby te wiadomości zostały usystematyzowane gatunkowo lub układowo. Uporządkować należałoby także nazewnictwo i pisownię niektórych wyrażen np. Treg, pisane czasem T_{Reg}, określane raz jako limfocyty T regulatorowe (właściwie), a raz jako komórki regulatorowe T. W przypadku wielu skrótów (np. CMT, GALT, GAPDH, DEPC) brakuje ich objaśnienia poprzez przytoczenie pełnej nazwy angielskiej i polskiego tłumaczenia lub też objaśnienie następuje dopiero po kilkukrotnym zastosowaniu skrótu np. Treg czy PCR. Na str. 11, w pierwszym zdaniu podrozdziału 3.3 przywoływana jest Ryc. 3, mimo iż zgodnie z kolejnością powinna tu być Ryc. 2, *nota bene* sekwencje, do których odnosi się to zdanie nie są widoczne ani na Ryc. 2 ani na Ryc. 3. Nie jest także podane źródło, z którego zaczerpnięto podane numery sekwencji (NCBI?). Pierwsze zdanie na str. 12 pokrywa się ze zdaniem występującym 13 wersów niżej. Cytowana na str. 13 Ryc. 2 to raczej tabela, podobnie zresztą jak Ryc. 8, a Ryc. 3 jest zdecydowanie gorszej jakości od analogicznej Ryc. 4, co trzeba będzie uwzględnić przygotowując pracę do druku w czasopiśmie naukowym. Pojawiają się także

pewne niezręczności językowe np. „...w zwiększonym poziomie ekspresji aktywacji powstawania naturalnie powstających limfocytów...” na str. 13 czy „HPRT to sekwencja genomowa, oznaczana jako HGPRT, jest genem...” na str. 20.

W rozdziale Cel pracy Doktorant bardzo lakonicznie przedstawia cel swoich badań, który nie jest do końca zbieżny z tytułem, bo forkhead box to kompleks różnych genów, wpływających nie tylko na wskaźniki odporności wrodzonej, ale także na inne układy regulacyjne (np. związek z jakością okrywy włosowej wskazany przez Doktoranta na str. 10).

Rozdział Materiał i metody jest dobrym i precyzyjnym opisem zastosowanych metod, ale również zyskałby na przejrzystości, gdyby dodano do niego schemat przeprowadzonych badań. Zapoznając się z pracą miałam np. wątpliwość, gdzie opisane są startery do techniki PCR charakteryzowanej na str. 32. Czy opis tej reakcji znajduje się na str. 33? Jeśli tak, to powinien być zamieszczony raczej przed opisem składu mieszaniny reakcyjnej i profilu temperaturowo-czasowego reakcji. Absolutnie niewłaściwe jest używanie określenia próba w odniesieniu do próbek pobieranych do badań mgr. inż. Wojtaszczyka od pojedynczych zwierząt. Terminy te nie są tożsame. Na str. 32 zamiast błędnego anglicyzmu aniling (właściwa pisownia annealing) powinno być wyrażenie synteza lub wydłużanie łańcucha. Tytuły Ryc. 14 i 15 należałoby doprecyzować, a elektroforegramy opisać. Po lekturze tego rozdziału nasunęły mi się następujące pytania:

- 1) Czy protokół izolacji RNA opisany na str. 31 jest autorskim opracowaniem Doktoranta? Czy może został zaczerpnięty z publikacji (wtedy przydałoby się cytowanie) bądź był modyfikowany w jakikolwiek sposób?
- 2) Czy do ekstrakcji RNA opisanego na str. 40 używano tych samych próbek krwi, które zostały opisane na str. 28? Jeśli tak, to co z materiałem, który w niektórych przypadkach był mrożony? Czy zastosowany protokół zakłada taką możliwość?

Rozdział Wyniki jest bardzo bogaty w liczne ryciny, ciekawie ilustrujące uzyskane w badaniach rezultaty. Przeprowadzono szereg analiz, w tym statystycznych, porównując wyniki pomiaru poziomu ekspresji wybranych genów w odniesieniu do różnych parametrów. Brakuje mi szczegółowego opisu do Ryc. 20, 21, 22, 23 – co oznaczają litery A, B, C, D, E, F, G, H przypisane do różnych kolorów? Na str. 51 znajduje się zdanie „W celu określenia prawidłowej dynamiki rozkładu wartości Ct przypisanych do każdego osobnika, ekspresję genów Foxp3 i HPRT wizualizowano w skali niemianowanej bazującej na ΔCq w odniesieniu do losowo

dobieranej wartości wyjściowej”. W analizie względnej powinno się badane próbki odnosić do stałego kalibratora i w tej dysertacji takim kalibratorem do porównywania poziomu ekspresji badanych genów u różnych ras psów domowych były mieszańce. Czemu w tym przypadku znajduje się zapis o losowo wybieranym kalibratorze? Ciekawi mnie również dlaczego do analizy względnej poziomu ekspresji genów nie wybrano najczęściej stosowanej w tym celu metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Bardzo żałuję także, że u zwierząt doświadczalnych nie zbadano żadnych parametrów laboratoryjnych związanych z funkcjonowaniem układu immunologicznego, co umożliwiłoby przełożenie pomiarów ekspresji genu *foxp3* uczestniczącego w regulacji procesów odpornościowych na rzeczywisty stan tego układu. W rozdziale Wyniki znalazły się także pewne niezręczności językowe np. „...gen HPRT pozwolił odnotować...”, „...wykazało zdecydowanie jednoznacznie wyższy...”, „Analiza poziomu ekspresji wewnątrzgatunkowej i międzygatunkowej genów...”, a podpunkt a) na str. 89 jest zupełnie niezrozumiały. Wymaga to dopracowania w trakcie przygotowywania dysertacji do druku. Niezależnie od tych drobnych zastrzeżeń, chcę podkreślić, że Doktorant dobrze poradził sobie z przedstawieniem uzyskanych danych i opracowaniem rozdziału Wyniki.

Rezultaty badań własnych zostały omówione i skonfrontowane z wynikami innych autorów w rozdziale Dyskusja. Doktorant nie unika polemiki z wynikami odbiegającymi od uzyskanych w badaniach własnych, lecz stara się znaleźć dla tych rozbieżności wytłumaczenie. Mankamentem tego rozdziału jest występowanie w nim zdań wielokrotnie złożonych i napisanych w taki sposób, że gubi się nieco ich główna myśl, co utrudnia płynne czytanie pracy np. „Zachowanie doboru losowego dyktowanego dostępnością materiału biologicznego pozyskiwanego w ramach praktyki lekarskiej, a co za tym idzie, budowanie grupy badanej na bazie założenia kryteriów wejściowych do rozkładu normalnego reprezentatywnego dla populacji faktycznie występujących w warunkach gospodarstw domowych osobników, może w kontekście przywołanych wyników potwierdzać dość silny potencjał heterozygotyczności badanych psów rasowych.”. Pewne sformułowania są także dość trudne w interpretacji np. „...ostrożnie uzasadnionych predykcji na temat założeń co do ich podobnych lokacji...”, „...ekspresja genu *Foxp3* jest parametrem przyjmującym kierunek o charakterystyce, która nie jest do końca wyjaśniona.”, czy „...zmiennosc międzyosobnicza genów *Foxp3* i *HPRT* wykazuje pewne cechy stabilności, ale jednocześnie jest widoczna w stopniu wystarczającym do budowania założeń różnicujących”. W moim odczuciu Dyskusja powinna być także znacznie skrócona o duże fragmenty, w których Doktorant dyskutuje wątki bardzo luźno związane ze swoimi badaniami np. wpływ hormonów na czynnik transkrypcyjny NF-kappaB,

dane o statusie oksydacyjnym, który w pracy nie był badany, czy zjawisko agresji u lisów. W podrozdziale o potencjale aplikacyjnym uzyskanych wyników w świetle uwarunkowań formalno-prawnych zabrakło mi konkretnych informacji co takiego Doktorant chciałby dodać, do jakiego protokołu i na podstawie jakich danych (wyniki badań poziomu ekspresji genów powinny być skonfrontowane z danymi klinicznymi). Generalnie Dyskusja w dużej mierze opiera się na przykładach wpływu genu *foxp3*, bezpośredniego lub pośredniego, na stany fizjologiczne i patologiczne u ludzi i zwierząt, których Doktorant niestety nie badał.

Mgr inż. Paweł Wojtaszczyk z przeprowadzonych badań wyciągnął aż 8 szczegółowych wniosków, które w mojej opinii nie zawsze mają pokrycie w uzyskanych wynikach. Wnioski nr 1 i 2 należy zakończyć na wyrażeniu „psa domowego”, potem robią się niejasne. Wniosek 3 należy podzielić na dwa odrębne – dotyczące osobno płci i osobno wieku. Wniosek nr 4 jest zdaniem recenzenta nieuzasadniony – nie można budować stwierdzenia bazując zaledwie na 2 badanych osobnikach rasy beagle, czy dwóch lisach odmiany płomienistej. Ekspresja różnych genów warunkowana jest szeregiem skomplikowanych układów regulacyjnych, na które znaczny wpływ mają czynniki osobnicze. Dlatego takie analizy powinny być prowadzone na znacznie większej liczbie psów należących do tej samej rasy, czy lisów tej samej odmiany, a wynik powinien być istotny statystycznie. Wniosek 5 jest raczej hipotezą wymagającą potwierdzenia, a wnioski 7 i 8 efektem przeglądu literatury, a nie konkretnych obserwacji poczynionych w badaniach własnych.

Rozdział „Piśmiennictwo” obejmuje 109 pozycji, uszeregowanych alfabetycznie, którym dodatkowo została nadana numeracja. W związku z tym, że w tekście pracy przywoływane są nazwiska autorów publikacji, na które powołuje się Doktorant, ta numeracja nie jest konieczna.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa stoi na dobrym poziomie naukowym, a wnoszone wcześniej uwagi krytyczne mają w większości charakter polemiczny i porządkowy. Zastosowana metodyka odpowiada standardom obowiązującym w tego typu badaniach. Doktorant wykazał dobre opanowanie warsztatu badawczego, a uzyskane wyniki stanowią istotny wkład do dotychczasowej wiedzy na temat kompleksu transkrypcyjnego forkhead box. W przypadku lisów pospolitych są to pierwsze tego typu badania nie tylko w Polsce, ale także na świecie. Stwierdzam, że rozprawa doktorska **mgr inż. Pawła Wojtaszczyka** pt. „**Badania nad określeniem poziomu zróżnicowania ekspresji genu *Foxp3* u lisa pospolitego *Vulpes***”

***vulpes* oraz ocena zróżnicowania poziomu jego ekspresji w porównaniu do psa domowego *Canis familiaris* w świetle funkcji czynników transkrypcyjnych forkhead box”** odpowiada wymogom określonym w art. 13 ust. 1 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), w związku z art. 179 ust. 3 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. z późn. zm. Przedkładam zatem Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Pawła Wojtaszczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Agata Banczerz-Kisiel, prof. UWM

