

Szczecin, dnia 24 listopada 2023 r.

dr hab. inż. Katarzyna Wojdak-Maksymiec, prof. ZUT
Katedra Genetyki
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pana Bartosza Czecha

*The application of bioinformatics tools for the analysis
of the genetic background of heat stress resistance in cattle*

**w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne
wykonanej w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
pod kierunkiem prof. dr hab. inż Joanny Szydy**

Podstawa prawna

Recenzja dotyczy pracy pt. *The application of bioinformatics tools for the analysis of the genetic background of heat stress resistance in cattle* w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne wykonanej przez Pana Bartosza Czecha w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Joanny Szydy i przy udziale promotora pomocniczego Prof. Gustavo de los Campos z Departamentu Epidemiologii (Michigan State University). Recenzja została sporządzona w związku z powołaniem mnie przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu do pełnienia funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora Panu mgr. Bartoszowi Czechowi.

Przedmiot rozprawy i jego znaczenie

Pan mgr Bartosz Czech podejmuje tematykę niezwykle ważną zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Porusza on problem stresu cieplnego u krów mlecznych, które ze względu na intensywne użytkowanie i przyspieszony metabolizm są narażone na zaburzenia termoregulacji. Zagadnienie to jest szczególnie istotne w świetle postępującego globalnego ocieplenia przyczyniającego się do systematycznego wzrostu temperatur stanowiącego zagrożenie dla zwierząt. Konsekwencjami stresu cieplnego są problemy zdrowotne, zahamowania wzrostu, problemy reprodukcyjne oraz zmniejszenie wydajności mlecznej. Rodzi to pilną potrzebę poznania długoterminowych skutków stresu cieplnego, stąd podjętą przez Doktoranta tematykę oceniam bardzo pozytywnie.

Kandydat podszedł do zagadnienia bardzo ambitnie, gdyż podjął się analizy reakcji krów mlecznych rasy holsztyńskiej na stres cieplny na poziomie mikrobiomu, transkryptomu i genomu. W swoich badaniach skupił się na wykorzystaniu metod bioinformatycznych. W dzisiejszych czasach olbrzymia ilość informacji i czasochłonność analiz zmuszają do optymalizacji metod badawczych i do wyboru najbardziej pomocnych i wiarygodnych narzędzi wspomagających pracę badacza.

Na dysertację składają się trzy odrębne artykuły, z których każdy rzuca światło na inne aspekty oddziaływania stresu cieplnego na organizm krowy:

1. Czech B., Szyda, J., Wang K., Luo H., Wang, Y. (2022). Fecal microbiota and their association with heat stress in *Bos taurus*. *BMC Microbiology* (Vol. 22, Issue 1). Springer Science and Business Media LLC.
2. Czech B., Wang, Y., Wang K., Luo H., Hu L., Szyda, J. (2022). Host transcriptome and microbiome interactions in Holstein cattle under heat stress condition. *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media SA.
3. Czech B, Wang Y., Szyda, J. (2023). Genome-wide association study of heat stress response in *Bos taurus*. Cold Spring Harbor Laboratory (w procesie recenzowania).

Dwa z nich ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, a ich współczynnik wpływu IF wynosił 4,465 oraz 6,064. Trzeci artykuł oczekuje na recenzje. Nie podano informacji o wkładzie Kandydata w powstawanie tych opracowań, jednak we wszystkich wymienionych artykułach jest on pierwszym autorem, co wskazuje na kluczową rolę w ich tworzeniu. Ponadto w dwóch publikacjach znalazła się informacja o roli poszczególnych autorów, jaką pełnili w zespole.

Pierwsze badanie stanowi kompleksową analizę wpływu stresu cieplnego na skład mikrobiomu kałowego bydła rasy chińskiej holsztyńskiej. W opracowaniu tym Autorzy, wykorzystując najnowocześniejsze techniki (molekularne, bioinformatyczne i statystyczne), podjęli próbę określenia powiązań łączących różne rodzaje i gromady drobnoustrojów z różnorodnymi aspektami stresu cieplnego. W drugim opracowaniu skupiono się na badaniu wpływu stresu cieplnego na transkryptom. Badanie to uwzględniało dwa kluczowe aspekty: po pierwsze, skrupulatną analizę wzorców ekspresji genów z wykorzystaniem danych dotyczących sekwencji RNA, a po drugie, wykorzystanie wcześniej uzyskanych wyników składu mikroflory do analizy zróżnicowanej społeczności drobnoustrojów zamieszkującej organizm. Autorzy podjęli się przeprowadzenia analizy zależności między ekspresją genów a mikroflorą w odpowiedzi na stres cieplny. Z kolei w trzecim badaniu poszukiwano asocjacji pomiędzy polimorfizmami pojedynczych nukleotydów (SNP) zidentyfikowanych za pomocą mikromacierzy oligonukleotydowych a tolerancją/podatnością na stres cieplny.

Poprawność i kompletność celów oraz hipotez badawczych

Kandydat jasno sformułował główny cel pracy, który polegał na ustaleniu wzajemnych zależności między składem mikrobiomu, wzorcami ekspresji genów, różnorodnością genetyczną i tolerancją na stres cieplny. Na osiągnięcie tego celu składały się cele szczegółowe, do których zaliczono: identyfikację i charakterystykę mikroflory kałowej związanej ze stresem cieplnym, wskazanie genów ulegających zróżnicowanej ekspresji pod wpływem stresu cieplnego, zbadanie dynamiki interakcji pomiędzy transkryptomem gospodarza (bydło) a mikrobiomem kałowym w warunkach stresu cieplnego oraz identyfikację powiązań pomiędzy zmiennością genetyczną a poziomem reakcji na stres cieplny. Hipotezy badawcze pośrednio wynikają z przeglądu literatury zagadnienia opisanej we wprowadzeniu do niniejszej dysertacji, a także z wprowadzeń do poszczególnych artykułów, ale Autor nie wyszczególnił ich w przedstawionym do recenzji opracowaniu. W rozdziale *Cel pracy* zawarł natomiast opis spodziewanych efektów podjętych badań.

Formalny aspekt rozprawy

Zarówno przygotowana rozprawa, jak i wchodzące w jej skład artykuły zostały zredagowane w języku angielskim. Tytuł pracy jest odpowiedni do zawartych w niej treści i dobrze odzwierciedla zakres realizowanych badań. Na liczącą 54 strony rozprawę składają się następujące części (rozdziały): *Streszczenie*, *Wprowadzenie*, *Cel*, *Publikacje składające się na rozprawę doktorską*, *Podsumowanie*, *Bibliografia* i *Osiągnięcia naukowe*. Nie jest to typowy układ

dysertacji doktorskiej, gdyż nie zawiera typowych rozdziałów, takich jak: *Material i metody*, *Omówienie wyników* i *Dyskusja*. Treści zwyczajowo opisywane w tych rozdziałach znalazły się w dołączonych do dysertacji publikacjach. Dla komfortu czytelnika wskazane byłoby jednak załączenie w opracowaniu syntetycznego zestawienia materiału badawczego, wykorzystanych metod i uzyskanych wyników

Struktura pracy jest poprawna, układ treści usystematyzowany i przejrzysty, tworzy interesującą i zwartą konstrukcję. Rozprawa jest dobrze napisana, komunikatywnym językiem, choć znalazły się w niej drobne uchybienia językowe i stylistyczne. Odbiór pracy w moim odczuciu utrudniają bardzo długie akapity, osiągające długość nawet półtorej strony, i to pisanej z pojedynczym odstępem pomiędzy wierszami. Momentami trudno więc podążać za myślą Autora. Odbiór pracy byłby też łatwiejszy, gdyby Doktorant sporządził wykaz wykorzystanych w pracy skrótów.

Rozdział Wprowadzenie

Obszerny rozdział *Wprowadzenie* w istocie jest raczej przeglądem literatury. Doktorant dokonał w nim bowiem prezentacji stanu wiedzy na podstawie literatury przedmiotu oraz udokumentował zasadność podjętych badań i zaprezentował potencjalne korzyści wynikające z uzyskania zakładanych rezultatów. Opracowania naukowe zostały tutaj poprawnie zacytowane (adekwatnie do opisywanych treści). Zgromadzona bibliografia liczy 124 pozycje, jest aktualna, anglojęzyczna i w większości publikowana w renomowanych czasopismach naukowych. Bardzo dobrze oceniam nie tylko znajomość i dobór źródeł, lecz także ich analizę i interpretację. Tekst tego rozdziału zyskałby jednak na przejrzystości, gdyby został podzielony na podrozdziały.

Autor omówił specyfikę podatności na stres cieplny wysokowydajnych krów mlecznych. Opisał także różnorodne konsekwencje produkcyjne, zdrowotne, reprodukcyjne i ekonomiczne. Zwrócił uwagę na opracowania, które potwierdzają, że stres cieplny może zmienić ekspresję genów zaangażowanych w układ odpornościowy, metabolizm i procesy rozrodcze. Analizując literaturę, Doktorant wykazał też, że sekwencjonowanie RNA można wykorzystać do ilościowego określenia poziomów ekspresji genów w odpowiedzi na stres cieplny. Do identyfikacji genów o różnej ekspresji u bydła poddanego i niepoddanego stresowi cieplnemu bardzo pomocne, w świetle przedstawionej literatury, wydają się narzędzia bioinformatyczne.

Ponadto Autor wskazał liczne opracowania, w których wykazano, że mikrobiom odgrywa kluczową rolę dla zdrowia zwierząt i może ulegać zmianom w odpowiedzi na stres

cieplny, wpływając na szereg procesów fizjologicznych, w tym wchłanianie składników odżywczych, funkcje odpornościowe i metabolizm. W analizowanych badaniach udowodniono, że stres cieplny moduluje liczebność określonych gatunków drobnoustrojów w żwaczu i kale bydła, zmniejszając liczbę pożytecznych bakterii, takich jak bakterie celulolityczne, i zwiększając liczbę patogenów oportunistycznych. Te zmiany w mikroflorze mogą mieć szereg konsekwencji dla zdrowia i produktywności bydła mlecznego. Autor w skrócie opisał także narzędzia oceny mikrobiomu i problematykę doboru właściwych metod.

Z analizy piśmiennictwa przeprowadzonej przez Pana Bartosza Czecha wynika też jasno, że w celu zidentyfikowania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) powiązanych z reakcją na stres cieplny u krów można posłużyć się metodą badania asocjacji całego genomu (GWAS). Wskazane w ten sposób SNP-y posiadają potencjał selekcji genomowej, przez co mogą zwiększyć efektywność prac hodowlanych zmierzających do zwiększenia tolerancji na ciepło.

Na koniec Autor sporo miejsca poświęcił omówieniu korzyści płynących z integracji danych z wielu platform, w tym genomiki, transkryptomiki i metagenomiki oraz mikrobiomiki. (takie podejście zyskało miano multiomiki). Multiomika może się przyczynić do pełniejszego zrozumienia złożonych układów biologicznych zaangażowanych w reakcję na stres cieplny u bydła.

Rozdział *Publikacje składające się na rozprawę doktorską*

W kolejnym rozdziale Kandydat zamieścił cykl artykułów stanowiących podstawę dysertacji i poprzedził je krótkimi streszczeniami. Niewątpliwie przyczyniło się to do łatwiejszego odbioru prezentowanych treści. Przedłożone publikacje mają strukturę typową dla opracowań naukowych. Zawierają wprowadzenia, w których krótko przytoczono najważniejsze ustalenia naukowe na wybrane tematy. W opracowaniach tych przedstawiono także wykorzystany materiał badawczy oraz zastosowane metody. Zaprezentowano również uzyskane wyniki, a w dyskusji skonfrontowano rezultaty pracy z doniesieniami innych autorów. Publikacje te zamieszczono w recenzowanych czasopismach naukowych, gdzie podlegały procedurze recenzowania. Pozytywne opinie recenzentów świadczą o poprawności formalnej i merytorycznej oraz o znaczeniu dla nauki uzyskanych rezultatów złożonych prac.

Rozdział *Podsumowanie*

Rozdział ten został podzielony na cztery części: w trzech pierwszych Autor zawarł syntetyczne podsumowania trzech prezentowanych artykułów, w czwartej omówił ograniczenia

badan własnych oraz zasugerował przyszłe kierunki prowadzenia badañ dotyczących stresu cieplnego u bydła.

Autor przypomniał, że pierwsze badanie ujawniło głębszy wpływ stresu cieplnego na skład mikrobiologiczny układu pokarmowego bydła. Wykazano, że mikrobiom, często nazywany „drugim genomem”, reaguje na zmiany fizjologiczne wynikające ze stresu cieplnego. Identyfikacja mikroflory kałowej powiązanej z temperaturą w odbycie, ślinieniem i ocenami oddechowymi wniosła nowe spojrzenie na reakcję drobnoustrojów na stres cieplny.

W drugim podrozdziale Kandydat podkreślił, że dzięki badaniu wykorzystującemu techniki sekwencjonowania RNA ujawniono powiązania między transkryptomem i mikrobiomem w postaci wzajemnych interakcji między tymi warstwami molekularnymi. Identyfikacja genów ulegających różnej ekspresji w kontekście różnych fenotypów stresu cieplnego umożliwiła wgląd w skomplikowane mechanizmy leżące u podstaw reakcji bydła.

Podsumowując trzecie badanie, skupiające się na czynnikach genetycznych wpływających na tolerancję bydła na stres cieplny, Doktorant przypomniał, że w pracy udało się zidentyfikować kluczowe polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) związane z podatnością na stres cieplny. Warto podkreślić, że polimorfizmy w genach PDZRN4 i PRKG1 dostarczyły markerów genetycznych o potencjalnych konsekwencjach dla programów hodowlanych. Identyfikacja tych markerów stanowi podstawę do selekcji mającej na celu zwiększenie tolerancji na stres cieplny w populacjach bydła. Szkoda, że w posumowaniu Autor nie podał pełnych nazw wytypowanych genów, a jedynie ich symbole.

W ostatniej części *Podsumowania* zostały omówione ograniczenia pracy. Autor słusznie zauważył, że niektóre powiązania lub trendy mogą pozostać niewykryte ze względu na ograniczoną liczebność próby badawczej, co należy wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników. Kandydat zwrócił też uwagę na problem braku danych stanowiący częste wyzwanie w badaniach multiomicznych. Problem ten pojawił się także w pracy Doktoranta, gdyż nie dysponowano wszystkimi danymi z zakresu genomu, transkryptomu i mikrobiomu dla każdego badanego osobnika, co utrudniało kompleksową analizę obejmującą wszystkie warstwy molekularne jednocześnie. Świadomość własnych ograniczeń i związana z tym ostrożność w interpretacji danych świadczą o naukowej dojrzałości Kandydata.

Rozdział Bibliografia

Wykaz publikacji uszeregowano w kolejności alfabetycznej. Znalazły się w nim 124 pozycje, co jak na zwyczaj panujący przy pisaniu rozpraw doktorskich i cytowaniu setek au-

torów, nie jest liczbą wygórowaną. Fakt ten oceniam pozytywnie, gdyż świadczy o umiejętności wyboru najcenniejszych opracowań, a zarazem unikania rozwlekłości. Spis nie budzi zastrzeżeń, dane bibliograficzne są pełne, jednak wkradły się tam drobne niekonsekwencje w ich zapisie.

Rozdział *Osiągnięcia naukowe*

W rozdziale tym Doktorant sporządził wykaz osiągnięć, na który składa się współautorstwo w 10 publikacjach naukowych, 10 prezentacji na konferencjach, udział w sesjach plakatowych na konferencjach naukowych, uczestnictwo w licznych kursach zawodowych, trzech stażach zawodowych w kraju i za granicą oraz liczne nagrody.

Konkluzja

Kandydatowi udało się zrealizować wszystkie zakładane cele badawcze. Łącznie badania przedstawione do recenzji zapewniają całościowe zrozumienie wieloaspektowych reakcji bydła na stres cieplny. Integracja genomiki, transkryptomiki i mikrobiomiki odsłoniła skomplikowane sieci regulujące reakcje biologiczne organizmu w reakcji na stres cieplny. Zidentyfikowane biomarkery i markery genetyczne otwierają obiecujące możliwości przyszłych badań, obejmujących opracowanie strategii łagodzących wpływ stresu cieplnego na dobrostan i produktywność zwierząt. W miarę systematycznych zmian klimatycznych wnioski uzyskane w toku przeprowadzonych badań mogą pomóc w podejmowaniu racjonalnych decyzji w zakresie zarządzania zwierzętami hodowlanymi i praktyk hodowlanych. Ponadto praca Doktoranta potwierdza ogromne znaczenie wykorzystania zdobyczy bioinformatycznych w kompleksowym analizowaniu złożonych zjawisk biologicznych.

Reasumując stwierdzam, że oceniana praca stanowi rzetelne i interesujące opracowanie naukowe, a wymienione nieliczne uwagi, które mają charakter sugestii, nie rzutują w sposób zasadniczy na ogólną ocenę pracy.

Recenzowana praca doktorska jest oryginalnym rozwiązaniem zaprezentowanego problemu badawczego i niewątpliwie nosi znamiona oryginalnej pracy twórczej. Autor podjął w niej tematykę, która ma istotne znaczenie zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Trafnie określił teoretyczne założenia pracy i jasno sformułował cele badawcze. Wykazał się też znajomością aktualnego piśmiennictwa i szeroką wiedzą na temat zagadnień poruszanych w rozprawie, a także umiejętnością planowania i wykonania badań naukowych. Interpretując uzyskane wyniki, wykazał się wnikliwością i naukową dojrzałością; wyciągnięte wnioski mają istotne implikacje praktyczne.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pana mgr. Bartosza Czecha spełnia warunki określone w art. 187, ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. 2023, poz. 742 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pana Bartosza Czecha do dalszych etapów przewodu doktorskiego.