



Wrocław, 05.01.2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Bartosza Czecha pt. "The application of bioinformatics tools for the analysis of the genetic background of heat stress resistance in cattle"**

W celu zwiększenia produktywności hodowle zwierząt są bardzo zintensyfikowane, co naraża je na duże obciążenie metaboliczne i niekorzystny wpływ wielu czynników stresowych, na które wyselekcjonowane rasy są słabo odporne. Jednym z takich czynników jest stres cieplny, który nabiera coraz większego znaczenia w związku z globalnym ocieplaniem się klimatu pod wpływem działalności człowieka. Stres cieplny niekorzystnie wpływa na samopoczucie, warunki bytowania oraz wiele procesów fizjologicznych hodowanych zwierząt prowadząc do zahamowania wzrostu oraz zmniejszenia produkcji i jakości mleka i mięsa. Mimo pewnych badań dotyczących tego czynnika na hodowlę zwierząt zjawiska te są wciąż słabo znane, a mają bardzo duże znaczenie praktyczne. Dlatego bardzo słusznie ambitnym przedmiotem pracy doktorskiej Pana magistra inżyniera Bartosza Czecha stało się wykorzystanie narzędzi bioinformatycznych do analizy genetycznego podłoża odporności na stres cieplny u bydła hodowlanego *Bos taurus*.

Rozprawa doktorska składa się z cyklu trzech prac, z których dwie zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach, *BMC Microbiology* i *Frontiers in Microbiology*, a trzecia jest w recenzji. We wszystkich przypadkach doktorant jest pierwszym autorem, a w dwóch dodatkowo autorem korespondencyjnym. Załączone oświadczenia nie pozostawiają wątpliwości o istotnym udziale Pana Bartosza Czecha w tych pracach, który polegał na zaplanowaniu i wykonaniu analiz, wizualizacji wyników i pisaniu manuskryptu.

Rozprawa została napisana w języku angielskim ze streszczeniem w języku polskim. Zawiera Spis treści, Listę publikacji, Abstrakt w języku angielskim i polskim, Wykaz skrótów, Wstęp wprowadzający do zagadnienia, Cele pracy, trzy rozdziały komentujące wyniki uzyskane w załączonych pracach, Podsumowanie, Literaturę i Osiągnięcia doktoranta. Podrozdziały w głównych częściach są poprawnie zorganizowane w sposób hierarchiczny, co zwiększa przejrzystość pracy. Opisy są dobrze zorganizowane pod względem formalnym i należy podkreślić poprawne sformatowanie i ładną szatę graficzną pracy.

W załączonych pracach przedstawiono wyniki badań mikrobiomu oraz analizy transkryptomyczne i genomiczne krów rasy Holstein w celu określenia wpływu stresu cieplnego na skład mikroorganizmów i ekspresję genów oraz zidentyfikowania markerów genetycznych związanych z odpornością na stres temperaturowy.

Wstęp jest przejrzyste napisany i odpowiedni dla wprowadzenia czytelnika do omawianych zagadnień oraz zrozumienia stawianych problemów. Przedstawiono w nim negatywny wpływ stresu cieplnego na bydło hodowlane. Wyjaśniano problemy z oddawaniem nadmiaru ciepła związane z ograniczeniami fizjologicznymi tych ssaków. Opisano skutki stresu na rozmnażanie oraz spadek wydajności i jakości produkcji mięsa i mleka. Wy tłumaczono te efekty na poziomie fizjologicznym w oparciu o zjawiska, takie jak: parowanie podczas oddychania, rozszerzanie naczyń krwionośnych, zmiany w produkcji hormonów i metabolizmie glukozy. Opisano także zjawiska na poziomie molekularnym związane ze zmianą ekspresji wielu genów, produkcją białek szoku termicznego i generowaniem wolnych rodników. Przedstawiono także związek mikrobiomu ze stresem cieplnym, który zmniejsza liczebność bakterii celulolitycznych, a zwiększa liczebność oportunistycznych patogenów. Przy opisie analiz ekspresji genów metodą RNA-seq oraz badaniach genomowych GWAS można by podać, jakie dotychczas analizy w tematyce doktoratu zostały dokonane przez innych autorów.

Cele są jasno sformułowane i dotyczyły: identyfikacji i charakterystyki mikroflory kałowej związanej ze stresem cieplnym, identyfikacji genów ulegających zróżnicowanej ekspresji pod wpływem stresu cieplnego, zbadania dynamiki interakcji pomiędzy transkryptomem gospodarza (bydła) i mikrobiomem kałowym w warunkach stresu cieplnego oraz identyfikacji powiązań pomiędzy zmiennością genetyczną a reakcją na stres cieplny. Cele pracy zostały poprawnie sformułowane i wszystkie zostały właściwie zrealizowane. Poza tymi celami wspomniano również o praktycznym zastosowaniu tych wyników w rozwój strategii hodowlanych i praktyk zarządzania hodowlą mających na celu poprawę dobrostan zwierząt, odporności, wydajności i produktywności bydła w warunkach stresu cieplnego.

W pierwszej pracy przedstawiono wyniki badań nad mikroflorą kałową i jej związek ze stresem cieplnym u bydła *Bos taurus*. Stres cieplny określono ilościowo za pomocą trzech wskaźników: temperatury w odbycie, intensywności ślinienia i wskaźników oddechowych. Mikrobiom charakteryzowano przy pomocy powszechnego markera 16S rRNA. Analizy wykazały, że 24 rodzaje i 12 typów jest istotnie powiązanych z parametrami stresu cieplnego. Mam w związku z tym pytanie. Czy doktorant zna odpowiedź na pytanie, dlaczego dane

rodzaje czy grupy bakterii były mniej lub bardziej liczne w badanych warunkach? Czy można to powiązać np. termofilnością tych bakterii?

Należy podkreślić, że w badaniach zastosowano odpowiedni aparat matematyczny, aby zlikwidować wpływ pochodzenia i powiązań rodzinnych badanych osobników oraz czynników środowiskowych, np. rok hodowli, etap laktacji, pora dnia w badaniu i indeks temperaturowo-wilgotnościowy. Podczas obrony prosiłbym doktoranta o szczegółowsze uzasadnienie i wytłumaczeni stosowanych metod. Mam również pytanie dotyczące badanych populacji. W Tabeli 1 podano, że było ich trzy, hodowanych w różnych latach i warunkach temperaturowych. Czy nie można było porównać tych trzech populacji pod względem mikrobiomu? Czy uniemożliwiało to wpływ różnych warunków hodowli, a zatem uzyskane zależności byłyby zaburzane przez inne czynniki? Na Ryc. 3 populacje te wyraźnie się różnią ze względu na warianty sekwencji mikroorganizmów. Czy określono, jakimi mikroorganizmami różniły się te populacje? W Tabeli 4 podano wartości współczynników korelacji Pearsona pomiędzy badanymi parametrami stresu cieplnego i zróżnicowaniem mikrobiomu. Nie były one jednak istotne statystycznie, co tłumaczono nieliniowymi zależnościami. Czy w związku z tym bardziej adekwatny byłby współczynnik korelacji Spearmana? Na Ryc. 4 wypadałoby podać, co oznaczają wartości przy węzłach drzewa filogenetycznego.

Druga praca porusza zagadnienie interakcji transkryptomu gospodarza i mikrobiomu bydła pod wpływem stresu cieplnego. W analizach wykorzystano podobny materiał badawczy i częściowo metodykę jak w poprzedniej pracy. W ten sam sposób wyrażono parametry stresu cieplnego. Zastosowano odpowiednie metody do analizy danych RNA-seq. Zidentyfikowano ponad 1800 genów, których ekspresja była związana z tymi czynnikami. Geny te były głównie powiązane z oddziaływaniami cytokin z odpowiednimi receptorami, infekcją wirusa HSV i ścieżką sygnałną PI3K-Akt. Nowym podejściem było zastosowanie ważonej sieci współekspresji w celu określenia interakcji transkryptom-mikrobiom. W oparciu o tą metodę stwierdzono 20 modułów genów i bakterii powiązanych ze sobą. Wyniki przedstawiono na Ryc. 5, ale nie wytłumaczono w opisie, co oznaczają kolory. W pracy stwierdzono, że mikrobiom wpływa na regulację ekspresję genów u gospodarza. Ale czy stwierdzone korelacje rzeczywiście oznaczają zakładaną przyczynowość? Czy obserwowany związek wynika z niezależnego wpływu stresu cieplnego na specyficzną ekspresję genów gospodarza i skład mikroorganizmów w danych warunkach? Mimo tych wątpliwości, uzyskane wyniki uważam za wartościowe i interesujące.

W trzeciej pracy doktorant przedstawił wyniki badań polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) przy pomocy mikromacierzy oligonukleotydowych. W celu określenia związku ze stresem cieplnym zastosowano te same trzy parametry stresu cieplnego. W pracy we wzorze 1 nie wytłumaczono jednak  $\mu$ . Warto zaznaczyć, że w przeciwieństwie do innych badań przeprowadzanych w kontrolowanych i sztucznych warunkach eksperymentalnych, tutaj zbadano populacje w naturalnych warunkach hodowlanych. Zidentyfikowano 17 SNPów rozmieszczonych na trzech chromosomach, które były silnie powiązane ze stresem cieplnym. Polimorfizmy te były związane z genami *PDZRN4* i *PRKG1*, o których wiadomo, że uczestniczą w szlaku degradacji białek i regulacji rozszerzania naczyń krwionośnych. Większość SNP znaleziono w intronach. Czy w związku z tym można to wiązać z wpływem na składanie eksonów i wycinanie intronów albo obecnością wzmacniaczy i wygaszaczy transkrypcji w intronach?

W Podsumowaniu doktorant w zwięzły sposób zebrał najważniejsze wyniki. Zaproponował, że specyficzne mikroorganizmy oraz geny o zmienionej ekspresji mogą być biomarkerami stresu cieplnego. Jednakże czy nie lepszymi wskaźnikami są wprost badane parametry fizjologiczne zwierząt? Warto zwrócić uwagę, że w tej części Pan Bartosz Czech obiektywnie i rzetelnie przedyskutował ograniczenia swoich wyników związane z małą wielkością próby, co może wpływać na istotność statystyczną wyników oraz nieuwzględnianie wszystkich czynników środowiskowych i zmienności osobniczej. Uzyskane wyniki są wartościowe. Poznanie mechanizmów wpływu stresu cieplnego na mikrobiom oraz ekspresję genów, a także zidentyfikowanie mutacji powiązanych z oporności na ten czynnik może pomóc w zmianie hodowli bydła i wyselekcjonowaniu nowych ras.

Stwierdzone przeze mnie zastrzeżenia wyrażone w formie pytań nie rzutują jednak na bardzo pozytywną ocenę pracy, a przedstawione powyżej uwagi nie zmniejszają wartości ocenianej rozprawy. Przeprowadzone badania były bardzo zasadne, ponieważ istnieje potrzeba zbadania i zrozumienia wpływu stresu temperaturowego na hodowlę zwierząt gospodarskich pod kątem fizjologicznym i molekularnym. Należy podkreślić, że analizy zostały przeprowadzone skrupulatnie, a zastosowana metodyka okazała się odpowiednia i skuteczna. To świadczy o dużej samodzielności i pracowitości doktoranta. Pan Bartosz Czech włożył dużo trudu w przeprowadzone analizy, a przedstawiona dyskusja wyników świadczy o jego dojrzałości naukowej i umiejętności wydobywania najważniejszych informacji z uzyskanych rezultatów oraz przedstawiania ich w formie zwartych wniosków.

Warto podkreślić, że doktorant jest współautorem dziewięć publikacji. Wyniki prezentował na konferencjach dziewięć razy w formie ustnej i dziewięć razy w formie posterów. Swój warsztat naukowy zdobywał na sześciu kursach i trzech stażach. Sześć razy był nagradzany za swoje osiągnięcia naukowe. W związku z tym, że doktorant postawił sobie trudny cel badawczy i go rozwiązał przeprowadzając odpowiednie analizy, a wyniki opisał w bardzo dobry sposób i opublikował proponuję wyróżnić rozprawę.

Uważam, więc, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023, poz. 742 ze zm.). Zgłaszam, zatem wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o uznanie rozprawy Pana mgra inża Bartosza Czecha za odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



Prof. dr hab. Paweł Mackiewicz