

dr hab. Katarzyna Ropka-Molik, prof. IZ  
Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt  
Instytut Zootechniki PIB  
Sarego 2, 31-047 Kraków  
Tel. 666 081 208  
e-mail. katarzyna.ropka@iz.edu.pl

Kraków, 24.01.2022

## RECENZJA

**osiągnięcia naukowego oraz całokształtu dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego oraz aktywności dr. Aleksandry Dunisławskiej w związku z postępowaniem habilitacyjnym w dziedzinie Nauk Rolniczych, dyscyplinie Zootechnika i Rybactwo wszczętym na Uniwersytecie Technologiczno-Przyrodniczym im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszcy**

Wniosek dr. Aleksandry Dunisławskiej o wszczęcie postępowania habilitacyjnego został przygotowany poprawnie i zgodnie z wymogami określonym dla postępowania habilitacyjnego. Podstawą do oceny wniosku stanowiło główne osiągnięcie naukowe w postaci cyklu 4 publikacji, oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie w powstanie prac wieloautorskich, autoreferat, wykaz pozostałych publikacji i osiągnięć naukowych oraz wykazana aktywność na polu działalności dydaktycznej, organizacyjnej i popularyzatorskiej.

### 1. Recenzja osiągnięcia naukowego

Jako główne osiągnięcie naukowe dr. Aleksandra Dunisławska przedstawiła cykl 4 publikacji pod wspólnym tytułem „Epigenetyczna regulacja ekspresji genów u kur po podaniu substancji bioaktywnych *in ovo*”. Dr. Aleksandra Dunisławska jest pierwszym i korespondencyjnym autorem w 3 publikacjach, a w jednej ostatnim i korespondencyjnym. Jej wkład w każdą z przedstawionych publikacji jest wiodący i stanowi od 50-75%. Autorka jasno i precyzyjnie przedstawiła swój udział w każdej z publikacji, który polegał między innymi na pozyskiwaniu finansowania na badania, sformułowaniu problemu badawczego i zaplanowaniu eksperymentu dotyczącego analiz genetycznych, wykonaniu części analiz laboratoryjnych, analizie wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. Oceniane publikacje ukazały się w latach 2020-2021 w czasopiśmie naukowych znajdujących się w bazie JCR. Ich łączna punktacja zgodnie z wytycznymi MEiN wynosi 410 pkt a sumaryczny współczynnik wpływu IF - 16,636.

K. Ropka-Molik

## Charakterystyka i ocena osiągnięcia

Koncepcja badań, stanowiących oceniane osiągnięcie naukowe, powstała na bazie wcześniejszych wyników uzyskanych przez autorkę i zespół badaczy. Udowodniono, że podanie prebiotyków lub symbiotyków *in ovo* modyfikuje profil bakteryjny w jelitach wpływając istotnie na skład i liczebność poszczególnych szczepów bakteryjnych, a tym samym na funkcjonowanie układu immunologicznego i pokarmowego kurcząt. Obiecujące wyniki wskazywały na korzystne oraz utrzymujące się przez cały okres ontogenezy efekty zdrowotne a także produkcyjne u drobiu.

Obecnie produkcja drobiarska napotyka wiele problemów a jednym z najważniejszych z nich jest zdrowotność ptaków, która przekłada się na opłacalność produkcji, jakość i bezpieczeństwo zdrowotne oraz jakość żywieniowa uzyskiwanych produktów. Masowa, intensywna produkcja sprawia, że zagrożenia zdrowotne w produkcji drobiarskiej stają się prawdziwym wyzwaniem. Elementem kluczowym jest utrzymanie ptaków w jak najlepszej kondycji zdrowotnej i podnoszenie standardów produkcji bez wykorzystania antybiotyków oraz innych niedozwolonych substancji. W celu zmniejszenia strat produkcyjnych i kosztów leczenia poszukuje się innych rozwiązań podnoszących zdrowotność ptaków, takich jak dodatki paszowe ziołowe czy fitogeniczne modyfikujące korzystnie mikroflorę jelitową i poprawiających zdrowotność u drobiu.

Jak dotąd, badania naukowe opierają się głównie na analizie składu mikrobiomu i ocenie wpływu regulacji jego składu na parametry produkcyjne oraz immunologiczne u ptaków. We wcześniejszych badaniach własnych prowadzonych w ramach doktoratu Autorka porusza tematykę wpływu iniekcji *in ovo* z wykorzystaniem symbiotyku lub prebiotyku na profil ekspresji genów zaangażowanych w funkcję układu pokarmowego oraz immunologicznego. Przykładem może być analiza transkryptomiczna wykonana na panelu tkanek pobranych od 21 dniowych kurcząt, gdzie wyniki potwierdziły istotny wpływ iniekcji *in ovo* na profil ekspresji genów (Dunislawska i in., 2019, Gene). Mechanizmy molekularne związane z metylacją DNA lub analizą cząsteczek miRNA zaangażowanych w regulację całych szlaków metabolicznych i sygnałowych bądź to pojedynczych genów i wpływających na prozdrowotne efekty fenotypowe nie zostały jeszcze dokładnie poznane. Badania prowadzone przez dr. Aleksandrę Dunislawską wpisują się w aspekt poznania molekularnych podstaw poprawy i utrzymania pożądanej kondycji zdrowotnej u kurcząt po podaniu substancji bioaktywnych *in ovo* w 12 dobie rozwoju embrionalnego. Badania realizowane przez autorkę stanowią nowatorski wkład w dotychczas poznana wiedzę i poszerzają dostępne informacje pozwalające lepiej zrozumieć zależności pomiędzy iniekcją *in ovo* substancji bioaktywnych a regulacją epigenetyczną DNA.

W celu realizacji celu głównego, którym była analiza epigenetycznej regulacji ekspresji genów u kur pod wpływem stymulacji mikrobioty jelitowej *in ovo* substancjami bioaktywnymi, autorka postawiła trzy cele szczegółowe, a ich realizację opisała w cyklu 4 publikacji. Postawiona hipoteza badawcza oraz realizowane cele obejmowały analizę genetyczną tkanek immunologicznych, jelitowych oraz tkanki związanej z metabolizmem (wątroba) u kur po stymulacji *in ovo* wykonanej w 12. dobie inkubacji jaj. Na powyższym materiale Autorka analizowała ekspresję wybranych genów (pub I); metylację oraz ekspresję genów w kontekście

K. Ropka-Kudłt

wyciszania genów (pub II) oraz zmiany w profilu metylacji DNA (pub III) i aktywności miRNA (pub IV).

W ramach poszczególnych publikacji badania genetyczne wykonywane były na odmiennych układach eksperymentalnych uwzględniających podanie różnych substancji bioaktywnych (probiotyków, prebiotyków lub symbiotyków), różnego genotypu kur czy analizy kilku okresów ontogenezy ptaków. Na podstawie uzyskanych wyników Autorka jednoznacznie potwierdziła istotny wpływ stymulacji *in ovo* różnymi substancjami na ekspresję panelu genów w tkankach jelitowych i immunologicznych u drobiu. Rodzaj odpowiedzi modularnej warunkowany był nie tylko typem zastosowanej substancji, ale również okresem czasowym, w którym analizowane były ptaki. Jako istotne novum ocenianego cyklu publikacji należy uznać analizy metylacji DNA przeprowadzone zarówno w skali oceny globalnej metylacji jak i dla pojedynczych, wybranych genów. Tematyka ta została podjęta przez Autorkę jako pierwszą a wykonane analizy genetyczne znacznie poszerzają wiedzę dotyczącą regulacji mechanizmów molekularnych zaangażowanych w procesy immunologiczne i metaboliczne warunkujące zdrowotność oraz cechy produkcyjne u drobiu. Stosując nowoczesne metody genetyki molekularnej Autorka wykazała istotne różnice w metylacji genów pomiędzy osobnikami reprezentującymi rodzimą rasę zielononózkę kuropatwianą oraz rasą towarową Ross 308 po podaniu tych samych substancji bioaktywnych *in ovo*. Uzyskane wyniki mogą wskazywać potencjalne mechanizmy warunkujące lepszą odporność na choroby i przystosowanie do warunków środowisko-żywnościowych obserwowane u badanej rasy rodzimej. Ponadto, w przypadku ptaków linii komercyjnej wykazano różnice w profilu metylacji DNA w zależności od podanej *in ovo* substancji bioaktywnej. Następnie, modyfikacje profilu metylacji wybranych genów na skutek iniekcji symbiotyku *in ovo* przeanalizowano także w tkance wątroby. Wykazano, istotny wzrost metylacji oraz jednoczesny spadek ekspresji genów związanych z metabolizmem lipidów, co wskazuje na możliwość regulacji cech fenotypowych jak otluszczenie czy metabolizm energetyczny ptaków przy wykorzystaniu mechanizmów epigenetycznych. Autorka potwierdziła również wpływ stymulacji *in ovo* na aktywność cząsteczek miRNA w wątrobie, na co wpływ miał rodzaj podanej substancji (probiotyk i symbiotyk) i genotyp ptaków (większą reakcję zaobserwowano u rasy rodzimej kur).

Prezentowane osiągnięcie ma charakter zarówno naukowy jak i aplikacyjny. Poznanie efektów i w przyszłości rozwój technik *in ovo* może stanowić rozwiązanie wybranych aspektów zdrowotności u drobiu. Uważam, że badania wnoszą istotny wkład w rozwój dyscypliny zootechnika i rybactwo.

## Uwagi krytyczne

Niezależnie od wskazanych powyżej oryginalnych osiągnięć Autorki jako Recenzent zauważam pewne nieścisłości oraz elementy polemiczne dotyczące przedstawionego cyklu publikacji i autoreferatu.

Cel główny zakłada analizę epigenetyczną regulacji ekspresji genów pod wpływem stymulacji **mikrobioty jelitowej** *in ovo* substancjami bioaktywnymi. Należy podkreślić, że analiza składu profilu bakteryjnego w jelitach nie była przedmiotem badań w przedstawionych

K. Rępta-Kolc

publikacjach. Autorka nawiązuje do wcześniejszych analiz własnych i danych literaturowych, na podstawie których wyciągnęła wnioski, że „iniekcja *in ovo* bezpośrednio stymuluje mikrobiom organizmu gospodarza, co pośrednio wpływa na zmiany ekspresji genów w różnych tkankach”. Na podstawie opisu doświadczeń w publikacji I wnioskuje, że analiza mikrobiomu była wykonana w ramach innych eksperymentów, na innej grupie ptaków niż analizy genetyczne prezentowane w publikacji (materiał pobrany w ramach projektu 2011/01/B/NZ9/00642; zgoda komisji eterycznej z 22/2012). Z kolei w publikacjach II-IV autorka opisuje wykonanie eksperymentów *in ovo* odnosząc się jednocześnie do badań własnych Dunisławska i in., 2017 (PloseOne, 2017; 12(1):e0168587), gdzie wykonywano analizy identyfikacji wybranych populacji mikroflory jelitowej. Z ocenianych publikacji nie wynika jednoznacznie czy by był to ten sam materiał biologiczny pobrany w ramach tego samego eksperymentu (np. materiał wykorzystany w pub. III - 2013/11/B/NZ9/00783, zgoda komisji etycznej 36/2012, podczas gdy materiał biologiczny w opracowaniu Dunisławska i in., 2017 został pozyskany w ramach projektu ECO-FCE nr 311794).

Reasumując, w przypadku badań wchodzących w skład ocenianego osiągnięcia nie wiemy czy i w jakim stopniu nastąpiła stymulacja mikrobioty jelitowej, a wnioskujemy jedynie na podstawie wcześniejszych eksperymentów. Autorka niejednokrotnie powołuje się na efekt stymulacji mikrobioty jelitowej przy barku opisanych wyników z tego zakresu. Inny zestaw substancji aktywnych, testowany w innym systemie utrzymania ptaków lub na innej linii ptaków może zupełnie inaczej oddziaływać na mikrobiom jelitowy.

Zatem trafniejsze było by sprecyzowanie celu jako „analizy epigenetycznej regulacji ekspresji genów pod wpływem iniekcji *in ovo* substancjami bioaktywnymi”, co lepiej oddaje rzeczywisty obraz wyników zawartych w ocenianym cyklu publikacji.

W autoreferacie autorka wielokrotnie podkreśla innowacyjność prowadzonych badań wskazując na analizę ekspresji w wielu tkankach (publikacja I), podanie innowacyjnego zestawu substancji bioaktywnych (publikacja II, IV) czy analizie efektu długofalowego zastosowanej iniekcji. W pełni zgadzam się z innowacyjnością przeprowadzonych eksperymentów jednak badania przedstawione w ocenianym cyklu publikacji są kontynuacją wcześniej wykonanych analiz z tego samego zakresu. Podobny zestaw tkanek oraz podawanych prebiotyków i symbiotyków analizowany był przez autorkę i zespół badaczy już wcześniej (jako element doktoratu autorki jak również i w innych badaniach). Uzyskane wyniki z wcześniejszych analiz transkryptomicznych zostały wykorzystane jako dane wejściowe do kolejnych analiz i poszerzonych eksperymentów opisanych w ramach ocenianego osiągnięcia. Większość analiz genetycznych wykonywana była na materiale pobranym w ramach innych projektów (2011-2013), który w mniejszym lub większym stopniu został już opisany wcześniej. Wcześniejsze badania obejmowały również 35 dzień życia kurcząt, podobnie jak i badania autorki podkreślające efekt długofalowy iniekcji *in ovo*.

Ponadto, tytuł ocenianego osiągnięcia - „Badanie epigenetycznej regulacji ekspresji genów u kur po podaniu substancji bioaktywnych *in ovo*” wskazuje na analizę mechanizmów epigenetycznych takich jak metylacja DNA czy ekspresja miRNA, lub też mechanizmów regulujących poziom transkrypcji innych niż czynniki genetyczne, czyli tym wypadku iniekcji *in ovo*. W ten ostatni obszar wpisuje się publikacja I, gdzie analizowano poziom ekspresji genów po iniekcji *in ovo* w 12 dobie embriogenezy.

K. Ropka-Malik

Dlatego też jako recenzent nie mogę zgodzić się z punktem pierwszym najważniejszych osiągnięć rozprawy habilitacyjnej, którym jest „podjęcie po raz pierwszy tematyki z zakresu epigenetycznej regulacji ekspresji genów u kur, którym podany został prebiotyk, probiotyk oraz symbiotyk *in ovo* w 12. dobie inkubacji jaj”. Jeśli traktujemy iniekcję substancji bioaktywnych *in ovo* jako czynnik epigenetyczny potencjalnie regulujący ekspresję genów to temat ten, był już badany i opisywany przez autorkę oraz zespół wielokrotnie i nie stanowi istotnego novum rozprawy habilitacyjnej (np. Sławińska i in., 2016, PloseOne; Dunisławska i in., 2019, Gene; Dunisławska i in., 2020, Animals).

W mojej opinii brakuje kompleksowego opracowania – analiza ekspresji genów, cząsteczek miRNA, metylacji DNA oraz profilu mikrobiomu jelitowego na tych samych zwierzętach, co ułatwiło by interpretację i wyciągnięcie wniosków. Jednak zdaję sobie sprawę z ograniczeń związanych z dostępnością materiały i ogromnymi kosztami analiz, dlatego proszę tą uwagę traktować jako sugestie w przyszłych badaniach.

### **Uwagi szczegółowe:**

Publikacja I - W publikacji I, Autorka zaznacza, że próbki RNA przetrzymywane były w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ze względu na szybką i stosunkowo łatwą degradację kwasu rybonukleinowego, próbki RNA powinny być przechowywane w  $-80^{\circ}\text{C}$ , co jest złotym standardem przy analizach ekspresji genów i RNA. Ponadto, zastosowane podejście statystyczne nie jest idealne dla tego typu danych. Autorka powinna najpierw zweryfikować rodzaj rozkładu danych i w przypadku rozkładu innego, niż normalny (charakterystycznego dla danych dotyczących ekspresji genów) zastosować test nieparametryczny. Różnice pomiędzy grupami pokazano w postaci różnic w wartości zlogarytmowanej fold change, brakuje informacji o średniej w grupach i co najważniejsze od odchyleniach standardowych w obrębie grup, które świadczą o wyrównaniu obserwacji w grupie. Ptaki w obrębie danej grupy badawczej trzymane były razem w jednym kojcu, czy próbowano zatem określić ewentualny „efekt kojca”? Analiza mikroflory bakteryjnej nie była przedmiotem badań, ale jeśli ptaki po stymulacji daną substancją bioaktywną *in ovo* utrzymywane były razem w jednym kojcu prawdopodobnie doszło by do wyrównania składu mikroflory jelitowej pomiędzy osobnikami.

Publikacja IV – Zauważyłam pewną nieścisłość pomiędzy autorem referatem a przedstawioną publikacją IV, mianowicie w autoreferacie Autorka zaznaczyła, że prebiotyk nie wykazywał właściwie wpływu na aktywność cząsteczek miRNA, a następnie podsumowała, że „w przypadku ekspresji miRNA nie wykazano istotnego wpływu genotypu, co sugeruje istotną przewagę substancji bioaktywnej *in ovo* nad podłożem genetycznym”. Z drugiej strony w opisywanej publikacji w abstrakcie zaznaczono, że na poziom aktywności miRNA miał wpływ zarówno genotyp jak i rodzaj substancji, a zaobserwowane zmiany były widoczne szczególnie mocno u rodzimej rasy natywnej.

Na koniec jeszcze jedna uwaga redakcyjna, autorka podając ilość punktów uzyskanych za publikacje wskazując jako źródło listę Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego - MNiSW podczas gdy ostatnie edycje listy (od 2020 roku) zostały wydane już przez Ministerstwo Edukacji i Nauki – MEiN.

K. Rapta - Kłóte

## 2. Ocena dorobku naukowego Habilitantki

Dorobek naukowy dr Aleksandry Dunisławskiej obejmuje 31 publikacji naukowych z podziałem na 19 prac oryginalnych i 12 przeglądowych; 2 rozdziały w monografiach oraz 45 komunikatów na konferencje krajowe i międzynarodowe. Spośród wszystkich 31 opracowań naukowych, 23 opublikowano w czasopismach z listy JCR, w tym 8 po uzyskaniu stopnia doktora, nie wliczając 4 publikacji reprezentujących osiągnięcie habilitacyjne. Działalność naukowa Habilitantki wpisuje się w szeroko pojęty obszar analiz wpływu substancji bioaktywnych na organizm, modyfikacjach epigenetycznych czy wykorzystaniu hodowli komórkowych jako modelu badawczego.

Publikacje Habilitantki zostały zacytowane 84 lub 91 razy w zależności od bazy danych oraz bez autocytacji. Indeks Hirsza wynosi 5. Należy pamiętać, że pierwsze publikacje Autorki ukazały się w roku 2016, więc biorąc pod uwagę cykl wydawniczy uzyskana ilość cytacji jest adekwatna do okresu, w którym publikuje Habilitantka. Habilitantka czynnie uczestniczyła w licznych konferencjach naukowych o czym świadczy przedstawionych 45 komunikatów, w tym 5 wystąpień po uzyskaniu stopnia doktora. Dr Aleksandra Dunisławska wykonała również 26 recenzji opracowań naukowych opublikowanych w międzynarodowych czasopismach.

Na uwagę zasługuje udział Habilitantki w 9 projektach badawczych finansowanych ze źródeł krajowych (takich jak NCN) oraz zagranicznych (między innymi UE). Autorka wskazała także na współpracy z 6 ośrodkami naukowymi, w tym 4 zagranicznymi. W ramach współpracy z dwoma Uniwersytetami, Autorka posiada dwie publikacje naukowe, z których jedna wchodzi w skład rozprawy habilitacyjnej i wykazana jest jako efekt współpracy z oboma ośrodkami naukowymi. Z kolei pozostałe inicjatywy zaowocowały jak odtąd złożeniem projektów badawczych będących w rozpatrywaniu. W mojej opinii złożenie wspólnego wniosku grantowego jest bardzo początkowym etapem współpracy naukowej, która będzie realna po uzyskaniu finansowania na badania. Również sama Autorka opisuje wymienione współpracy w formie planów na przyszłość. Na uwagę zasługują liczne nagrody i wyróżnienia, które otrzymała Habilitantka za wybitne osiągnięcia naukowe przed obroną doktoratu za wyróżniającą się rozprawę doktorską oraz Nagrodę Rektora UTP otrzymaną już po uzyskaniu stopnia doktora.

## 3. Ocena działalności dydaktycznej, organizacyjnej popularyzatorskiej i eksperckiej

Habilitantka jest aktywnym nauczycielem akademickim – prowadziła bądź prowadzi 14 przedmiotów na czterech kierunkach studiów – Zootechnika, Inspekcja weterynaryjna, Zoofizjoterapia i Biotechnologia. Dodatkowo, Habilitantka realizowała przedmioty w języku angielskim w ramach programu ERAZMUS+ oraz jest autorką treści dwóch przedmiotów. Dr Aleksandra Dunisławska była również opiekunem 3 prac inżynierskich, 2 prac magisterskich, a kolejne 7 jest w trakcie realizacji.

*K. Rajta-Politz*

Do ważnych form aktywności organizacyjnej Habilitantki należy zaliczyć członkostwo w Radzie Naukowej Wydziału macierzystego, Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo oraz Radzie Programowej kierunku studiów Biotechnologia. Habilitantka była również członkiem komitetu organizacyjnego i naukowego w konferencjach organizowanych dla doktorantów. Ważnym przejawem aktywności popularyzatorskiej są wystąpienia Habilitantki na konferencjach międzynarodowych i krajowych – 13 prezentacji ustnych, 7 posterowych oraz 2 wykłady na zaproszenie (w tym 3 postery oraz dwie prezentacje ustne po uzyskaniu stopnia doktora).

#### **4. Wnioski końcowe**

Wyniki zaprezentowane w ramach przedstawionego cyklu publikacji stanowią kompleksowe opracowanie dotyczące epigenetycznych modyfikacji u drobiu po iniekcji in ovo. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań w tym zakresie, a przedstawione badania wnoszą istotny wkład w rozwój dyscypliny zootechnika i rybactwo. W toku recenzji wypunktowano liczne uwagi i nieścisłości pomiędzy autoreferatem a przedstawionym osiągnięciem w postaci cyklu publikacji. Dla wybranych elementów osiągnięcia jego nowatorstwo można zakwestionować ze względu na elementy tożsame z badaniami prowadzonymi przez Autorkę w ramach pracy doktorskiej oraz innych projektów badawczych. Jednak biorąc pod uwagę informacje zawarte w ocenianym osiągnięciu naukowym w postaci publikacji, zastosowane metody badawcze i uzyskane wyniki stwierdzam, że osiągnięcie stanowi cenny wkład do nauki zarówno krajowej jak i międzynarodowej. Podjęta tematyka jest bardzo interesująca, a uzyskane wyniki wpisują się w obszar zarówno badań podstawowych, jak i posiadają znaczący potencjał aplikacyjny w przyszłości.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że niniejsza praca habilitacyjna spełnia wymogi określone w artykule 219 ust. 1 pkt. 2 i 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.) i wnoszę o dopuszczenie dr Aleksandry Dunisławskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie Nauk Rolniczych dyscyplinie Zootechnika i Rybactwo.

*dr hab. Katarzyna Ropka-Molik, prof. IZ*

*Katarzyna Ropka-Molik*