

Szczecin, 15.11.2023 r.

Prof. dr hab. Violetta Dziedziejko
Katedra Biochemii i Chemii Medycznej
Samodzielna Pracownia Biochemii Farmaceutycznej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Al. Powstańców Wlkp. 72
70-111 Szczecin

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Anny Stanisławczyk, z tytułowanej: "Asocjacje pomiędzy polimorficznymi wariantami wybranych genów zaangażowanych w procesie autofagii a odpornością na *mastitis* u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej".

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Katarzyny Wojdak-Maksymiec, prof. ZUT w Katedrze Genetyki na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Znaczenie podjętej tematyki badawczej

Współczesne bydło rasy holsztyńsko-fryzyjskiej wymaga zaspokojenia potrzeb w kwestii żywienia, utrzymania oraz zarządzania stadem by w pełni ujawnić swoje założenia genetyczne dotyczące wysokiej produkcji mleka.

Zapalenie wymienia (*mastitis*) jest jedną z najbardziej kosztownych chorób dotykających stada bydła mlecznego. Bezpośredni skutek ekonomiczny jest związany z obniżeniem ilości i jakości mleka, zwiększeniem kosztów interwencji weterynaryjnych, odrzuceniem mleka przez mleczarnie i karami za przekroczenie poziomu liczby komórek somatycznych.

Mastitis jest chorobą wieloczynnikową, w której otoczenie, patogeny i gospodarz (krowa) wchodzi ze sobą w interakcje. Znanych jest wiele czynników wywołujących tę chorobę – bakterie z grupy Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, chorobotwórcze grzyby, wirusy (np. BVD; wirusowa biegunka bydła). Część z tych czynników związana jest z organizmem samego zwierzęcia, inne zaś ze środowiskiem (są to tzw. zarazki wszędobyłskie, znajdujące się w otoczeniu krowy). Pierwsze przenoszone są podczas doju, drugie znacznie bardziej niebezpieczne zasiedlają m.in. brudne legowiska. Na *mastitis* wpływają także czynniki niezakaźne jak stres (zwłaszcza cieplny), kulawizny czy żywienie, a także częstotliwość doju.

Jak wspomniano wyżej *mastitis* czy ogólnie ujmując stan zdrowotny wymienia jest główną, ale nie jedyną przyczyną zmian liczby komórek somatycznych obserwowanych w

mleku krów. Innymi czynnikami mającymi wpływ na zawartość komórek somatycznych w mleku są m.in. wiek krów, stadium laktacji, pora roku, rodzaj aparatury udojowej i higiena doju, wydajność mleczna, wielkość stada, położenie geograficzne obory, a wśród czynników wymienić należy także uwarunkowania genetyczne. Ilość problemów ze zdrowotnością wymion jest w ogromnej części uzależniona od warunków oraz zarządzania, jednak badania pokazują, że dokonując odpowiedniej selekcji, jesteśmy w stanie wpływać na poziom problemów z *mastitis* także poprzez genetykę. Zaobserwowano genetyczne różnice w podatności/odporności na *mastitis* wśród bydła. Odporność czy też podatność na *mastitis* jest cechą wielogenową i bardzo trudno prześledzić sposób dziedziczenia tej choroby ze względu na istnienie pozaaddytywnych oddziaływań pomiędzy genami, a także interakcje pomiędzy genami a środowiskiem. Dlatego od dłuższego czasu ulepsza się i modyfikuje wskaźniki i indeksy, które pozwolą na lepszą selekcję w kierunku tej niezmiernie istotnej cechy. Ze względu na niską odziedziczalność odporności na infekcje gruczołu mlecznego poszukiwane są markery genetyczne, które są szczególnie przydatne w doskonaleniu zwierząt w takich sytuacjach.

Uważam, że temat podjęty przez Doktorantkę w niniejszej rozprawie doktorskiej jest **niezwykle ważny i aktualny**, tak pod względem poznawczym, jak i profilaktycznym w działalności weterynaryjnej. Dodatkowo może w przyszłości mieć pozytywne przełożenie ekonomiczne.

Charakterystyka pracy

Układ przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej jest klasyczny. Rozprawa liczy 170 stron i ma typowy układ pracy doktorskiej zawierający wstęp, cel, przegląd literatury, materiały, metodologię, wyniki badań i ich omówienie, dyskusję, podsumowanie i wnioski, bogate piśmiennictwo, streszczenie, wykaz skrótów, wykaz tabel oraz dane uzupełniające. W pracy znajduje się 40 tabel (cztery z nich w „danych uzupełniających”).

Rozprawę doktorską otwiera bardzo obszerna, rzeczowo napisana część teoretyczna. Autorka skrupulatnie wprowadza czytelnika w podjętą tematykę jaką jest zapalenie gruczołu mlekowego u krów, a w szczególności jego diagnostykę, przyczyny, leczenie i konsekwencje tej choroby. Dodatkowo opisuje czynniki środowiskowe i genetyczne związane z rozwojem *mastitis*. W ostatnim podrozdziale wyjaśnia mechanizm działania, rodzaje autofagii oraz precyzyjnie charakteryzuje wybrane geny i ich białkowe produkty uczestniczące w tym procesie.

Pozytywnie oceniam ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie tematu pracy. Autorka dokonała szczegółowego przeglądu piśmiennictwa w w/w obszarze. Część

teoretyczna rozprawy napisana została zgodnie z aktualnym stanem wiedzy w zakresie omawianych zagadnień i ma istotny związek z częścią badawczą pracy. Jednakże w ocenie recenzentki „przeгляд literatury” nie straciłby na wartości merytorycznej gdyby był nieznacznie krótszy/zwięzły.

Mając na uwadze powyższe fakty, zasadnym jest podjęte przez Doktorantkę zagadnienie dotyczące zweryfikowania hipotezy dotyczącej istnienia asocjacji pomiędzy polimorficznymi wariantami genów, których produkty uczestniczą w procesie autofagii a odpornością na *mastitis* u krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej z uwzględnieniem efektów dominacyjnych, epistatycznych oraz interakcji genotyp x środowisko. **Cel pracy jest zrozumiały i zgodny z zawartością tematyczną prowadzonych badań.**

Szczegółowe cele obejmowały między innymi: identyfikację polimorficznych wariantów wybranych genów (*CTSD*, *PRKCQ*, *SH3GLB1*, *BCL2*, *ATG14*) oraz oszacowanie częstości alleli i genotypów występujących w badanej grupie krów; ustalenie związków pomiędzy polimorfizmem wybranych genów (*CTSD*, *PRKCQ*, *SH3GLB*, *BCL2*, *ATG14*) a odpornością na *mastitis*, z uwzględnieniem różnych warunków środowiskowych; ustalenie, czy addytywne i nieaddytywne efekty badanych genów są stałe, czy też zmieniają się w zależności od kolejnej laktacji; wykazanie istnienia ewentualnych efektów dominacyjnych i epistatycznych pomiędzy genetycznymi wariantami wytypowanych genów (*CTSD*, *PRKCQ*, *SH3GLB1*, *BCL2*, *ATG14*) w kształtowaniu zmienności liczby komórek somatycznych; zweryfikowanie hipotez dotyczących możliwości wykorzystania badanych genów (*CTSD*, *PRKCQ*, *SH3GLB1*, *BCL2*, *ATG14*) jako markerów w selekcji prowadzonej w kierunku odporności na *mastitis* oraz użyteczności mlecznej bydła.

W rozdziale „Materiał i metody” przedstawiono charakterystykę badanej grupy. Badaniami objęto 745 krów mlecznych rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Zwierzęta utrzymywane były w tej samej oborze wolnostanowiskowej i hodowane w identycznych warunkach środowiskowych, co jest niezwykle istotne przy tego typu badaniach. W tej części opisu zabrakło liczebności krów w poszczególnych klasach podzielonych wg przebiegu laktacji (od I-szej do VIII-ej). Doktorantka również nie podała liczebności w klasach połączonych VI, VII i VIII łącznie – wskazując jedynie że liczebność była mała, warto byłoby tę liczebność podać.

Z krwi obwodowej pochodzącej od badanych krów wyizolowano DNA. Identyfikację wybranych polimorfizmów genów *CTSD*, *PRKCQ*, *SH3GLB1*, *BCL2* i *ATG14* (wszystkie typu

insercja-delecja) przeprowadzono za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy PCR. Wykonanie tak dużej ilości analiz laboratoryjnych/genetycznych (745 prób x 5 polimorfizmów = 3725 analiz) wymagało dużego nakładu pracy i czasu. W ocenie recenzentki zabrakło tu przedstawienia przykładowych rozdziałów elektroforetycznych (w postaci zdjęć) próbek kolejnych polimorfizmów z opisem długości otrzymywanych produktów.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, w której dobór stosowanych metod i narzędzi statystycznych jest właściwy. W poprawny sposób przedstawiono trudne zagadnienia matematyczno-statystyczne i użyte modele w pracy.

Otrzymane obszerne wyniki opisano w trzech podrozdziałach w sposób zrozumiały i zaprezentowano w 29 przejrzystych tabelach wewnątrz rozdziału „wyniki”, a cztery w „danych uzupełniających”. Wyniki pracy są wartościowe i oryginalne, świadczą o skrupulatności i rzetelności Autorki. Tabele są prawidłowo opisane i zawierają szczegółowe legendy pod tabelami. Doktorantka wyjaśniła dlaczego w analizie statystycznej pominięto wyniki badań polimorfizmu genów *BCL2* i *ATG14*. W przypadku genów *BCL2* i *ATG14* występował tylko jeden wariant genu (monomorfizm) i z uwagi na ten fakt w pracy zostały przeanalizowane asocjacje z badanymi cechami jedynie dla genów *CTSD*, *PRKCQ* i *SH3GLB1*.

Rozdział „Dyskusja” została podzielona na cztery podrozdziały, zgodnie z wcześniejszym opisem wyników i założonymi celami pracy. Obejmuje ona 12 stron maszynopisu. Doktorantka analizuje i interpretuje swoje wyniki, odnosi się do cytowanej literatury. Zgadzam się z Autorką, że wiele prac badawczych uwzględnia w modelach statystycznych jedynie proste sumowanie efektów alleli danych genów, które nie odzwierciedla w pełni naturalnego mechanizmu dziedziczenia. Dlatego zasadne jest włączanie w badaniach efektu dominacji, epistazy oraz interakcji genotypu ze środowiskiem, co uczyniła Doktorantka. Analiza piśmiennictwa wskazuje na niewielką ilość prac związanych z w/w tematem. Na podkreślenie zasługuje fakt, że **niniejsza praca jest pierwszym badaniem potwierdzającym istnienie asocjacji pomiędzy polimorfizmami genów, których produkty uczestniczą w procesie autofagii, a odpornością na *mastiitis* u bydła mlecznego.**

Z roli recenzentki muszę stwierdzić, iż trochę za dużo uwagi w dyskusji poświęcono ponownie samemu procesowi autofagii (scharakteryzowano ten proces już we wstępie). W tym rozdziale zabrakło szerszego własnego punkt widzenia na otrzymane wyniki badań.

W dysertacji zamieszczono siedem wniosków wynikających z założonego celu i zawartych w nim zadań badawczych. Pragnę zauważyć, że wnioski pierwszy, drugi i trzeci to

raczej wyniki. We wnioskach drugim i trzecim zabrakło wskazania czy otrzymane statystycznie istotne asocjacje/związki mają charakter pozytywny/negatywny.

Cytowane piśmiennictwo jest bardzo obszerne obejmuje 316 pozycji literaturowych, w zdecydowanej większości anglojęzycznych. Ponad połowa piśmiennictwa (57%) to prace z ostatnich 13 lat (w tym około 10 % z trzech ostatnich lat). Format piśmiennictwa jest jednolity. W opinii recenzentki należy unikać cytowania bardzo starych już prac np. z 1954, 1983.

Doktorantka dodatkowo umieściła w rozprawie streszczenie które w sposób zwięzły prezentuje cel badań, wyniki i wnioski.

Oceniana rozprawa nie budzi zastrzeżeń merytorycznych, a przytoczone poniżej uwagi mają charakter redakcyjny, są niedoskonałościami językowymi lub są sugestiami, które mogą być uwzględnione podczas przygotowania publikacji do druku.

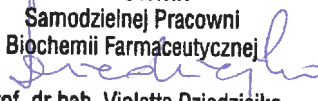
- 1) str. 15 „aktywności dehydratu mleczanu genazy (LDH)” ??? powinno być dehydrogenazy mleczanowej
- 2) str. 37 „kompleksu oksydazy fosforanowej dinukleotydu nikotyn amidowego” – Doktorantka chyba miała na myśli oksydazę NADP(H) czyli oksydazę fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
- 3) sporo błędnych końcówek – tzw. literówki np. str 16, 108, 111
- 4) nazwy genów powinny być pisane kursywą – nie zawsze ta zasada została zachowana np. str. 36
- 5) niezręczność językowa – str. 36 „Genotyp GA i AA miały znacząco wyższy SCS niż genotyp GG” – genotyp nie może mieć SCC.
- 6) w tabelach 8,9,10 – wystarczyłoby zaprezentować wyniki do jednego miejsca po przecinku – zasada cyfr znaczących
- 7) tabela 11 i tekst na str. 63 zostały obcięte
- 8) dobrze byłoby umieścić w pracy tzw. „ograniczenia w pracy”.

Wniosek końcowy:

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Stanisławczyk zatytułowana "Asocjacje pomiędzy polimorficznymi wariantami wybranych genów zaangażowanych w procesie autofagii a odpornością na *mastitis* u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej" stanowi wartościowe opracowanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i

tytule naukowym oraz stopniach i tytułach z zakresu sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789).

Mam przyjemność wnioskować do Wysokiej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie **o dopuszczenie Pani mgr Anny Stanisławczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem nadania stopnia naukowego doktora.**

KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni
Biochemii Farmaceutycznej

prof. dr hab. Violetta Dziejko