

Olsztyn, 21.07.2023 r.

Prof. dr hab. Urszula Czarnik  
Wydział Bioinżynierii Zwierząt  
UWM w Olsztynie

Recenzja pracy doktorskiej mgr Kai Prüffer

pt. **Polimorfizm wybranych *miRNA* związanych z odpornością na mastitis,**

wykonanej pod kierunkiem

**dr hab. inż. Katarzyny Wojdak-Maksymiec, prof. ZUT**

### **Ocena wyboru i znaczenia podjętej tematyki badawczej**

Badania nad podłożem genetycznym odporności/podatności bydła na stany zapalne gruczołu mlekowego, mają stosunkowo długą historię. Występowanie zaburzeń czynnościowych wymienia określanych jako *mastitis* należy uznać za „chorobę zawodową” krów mlecznych. Intensyfikacja badań stymulowana jest nieporównywalnie dużymi stratami gospodarczymi, w zestawieniu z innymi chorobami bydła. Koszty diagnostyki, profilaktyki, leczenia, przedwczesnej eliminacji zwierząt podatnych, zmniejszenie wydajności i dyskwalifikacja mleka pozyskiwanego od krów chorych są bardzo wysokie. Czynnikiem patogennym są na ogół bakterie, przenoszone przez kanał strzykowy. Powszechnie przyjętym wskaźnikiem zdrowotności wymienia jest liczba występujących w mleku elementów komórkowych (*somatic cells score* – SCS lub *liczba komórek somatycznych* - LKS).

Odporność jest cechą o nadrzędnym znaczeniu w całości mechanizmów sprawności czynnościowej organizmu. Wykorzystanie naturalnych predyspozycji obronnych, niweczących oddziaływanie czynników patogennych było i jest nadal w centrum zainteresowania nauki i praktyki hodowlanej. Doskonalenie odporności jako poligenicznej cechy ilościowej jest jednak utrudnione ze względu na niską odziedziczalność, nieaddytywny charakter uwarunkowania przejawów odporności i różnorodność form ekspresji. Mimo dużego zaangażowania licznych światowych ośrodków naukowych dotychczas nie rozpoznano ewentualnych genetycznych predyspozycji bydła do zapadalności na *mastitis*. Jednym z alternatywnych podejść jest rozpoznanie genów a w ich obrębie mutacji związanych z modelowaniem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Dlatego uważam, że podjęta tematyka badawcza



w przedłożonej do oceny rozprawie doktorskiej dotycząca detekcji związku między polimorfizmem w wybranych *microRNA* a odpornością/podatnością krów mlecznych na *mastitis* jest w pełni uzasadniona i wpisuje się w cykl prowadzonych badań.

### **Charakterystyka pracy**

Praca doktorska mgr **Kai Prüffer** ma charakter poznawczy i stanowi syntezę wiedzy na temat rozpoznania ewentualnych związków między polimorfizmem pojedynczych nukleotydów (SNP) wybranych genów *microRNA*, które zgodnie ze wskazaniami literaturowymi mogą być zaangażowane w procesy immunologiczne, co może również sugerować związek z odpornością/podatnością krów na *mastitis*. Ma ona formę klasycznej rozprawy naukowej i obejmuje rozdziały: Wstęp, Przegląd piśmiennictwa, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografia, tworzące łącznie wraz ze spisem treści, spisem wykresów i tabel, streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz aneksem zawierającym tabele odnoszącymi się do części wynikowej pracy, przejrzystą strukturę całości opracowania, liczącą 132 strony maszynopisu. Dysertacja została napisana z zachowaniem właściwej sekwencji omawianych zagadnień a poszczególne fragmenty tekstu zawierają informacje podane w sposób uporządkowany i przejrzysty. Na podkreślenie zasługuje staranność przygotowana strony graficznej a zamieszczone ryciny i tabele umożliwiają śledzenie omawianych zagadnień. Wykaz cytowanej literatury jest obszerny i obejmuje 211 pozycji, w tym zaledwie 4 to opracowania polskojęzyczne. Zdecydowana większość prac została opublikowana w czasopismach o uznanej renomie międzynarodowej a 92 (44%) prace pochodzi z ostatnich 10. lat. Pozycje piśmiennictwa, mimo ich dużej liczby, dobrane zostały w sposób przemyślany i ograniczony głównie do zakresu badań.

Problematykę rozprawy Autorka zasygnalizowała w trzystronicowym wstępie, w którym skupiła się na uzasadnieniu potrzeby kontynuowania badań nad wskazaniem genetycznych markerów odporności/podatności krów na *mastitis*. W rozdziale **Przegląd piśmiennictwa** podzielonym na 7 podrozdziałów i liczącym 35 stron maszynopisu Autorka wprowadza w tematykę badawczą. W sposób czytelny omawia problem występowania stanów zapalnych gruczołu mlekowego u bydła mlecznego z uwzględnieniem jego wpływu na wydajność i skład mleka oraz wskazuje czynniki patogenne je wywołujące. W dalszej części chronologicznie omawia stosowane metody diagnostyczne, począwszy od najprostszych, polegających na określaniu liczby komórek somatycznych, a następnie skupia się na analizach mikrobiologicznych, badaniu



wzrokowym i palpacyjnym wymienia, przewodności mleka i jego zmienności jonowej oraz monitorowaniu zawartości laktozy. W dalszej części przedstawia tematykę fizjologicznych podstaw odpowiedzi immunologicznej organizmu zamieszczając wiedzę na temat odpowiedzi nieswoistej i swoistej z podziałem na pierwotną i wtórną. W kolejnych podrozdziałach skupia się na omówieniu czynników środowiskowych a następnie genetycznych, w obrębie których omawia problem odziedziczalności odporności na *mastitis*, dziedziczenie cech ilościowych, zjawisko dziedziczenia poligenicznego i nieallelicznego współdziałania genów oraz plejotropii. W ostatnim podrozdziale Autorka dokonuje przeglądu wiedzy na temat biogenezy *microRNA* i ich funkcji w odporności na infekcje, po czym formułuje hipotezę badawczą a następnie charakteryzuje 5 genów *microRNA* uwzględnionych w badaniach.

Podsumowując ten rozdział pracy uważam, że został on zbyt rozbudowany poprzez zamieszczenia w mojej ocenie dość powszechnej wiedzy dotyczącej np.:

- wpływu *mastitis* na wydajność i skład mleka,
- metod pomiaru liczby komórek somatycznych,
- informacji o mechanizmach odpowiedzi immunologicznej,
- genetycznego uwarunkowania cech.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym **Cel pracy** Doktorantka przedstawia cel ogólny wykonywanych badań z pięcioma zadaniami składającymi się na jego realizację. Zostały one sformułowane poprawnie a na podkreślenie zasługuje zakres zaplanowanych analiz statystycznych. W mojej ocenie w rozdziale tym powinna być zamieszczona hipoteza badawcza, która niejednoznacznie została zdefiniowana i znajduje się na str. 44. a tytuł rozdziału powinien zostać zmieniony na Hipoteza badawcza i cel pracy.

W rozdziale **Materiał i metody** zamieszczonym na 9 str. maszynopisu Autorka opisała materiał zwierzęcy, przeprowadzone analizy laboratoryjne oraz kolejność działań statystycznych zmierzających do osiągnięcia założonego celu pracy. W badaniach uwzględniła 664 krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej w okresie od pierwszej do ósmej laktacji. Należy podkreślić, że były one utrzymywane w tych samych warunkach środowiskowych, co jest niezwykle ważne w badaniach nad opornością/podatnością krów na *mastitis*. Szkoda, że nie podała przedziału czasowego, co doprecyzowałoby informację dotyczącą jednolitości warunków. Materiałem do badań polimorfizmu była krew obwodowa, natomiast bazę danych stanowiły wyniki kontroli użytkowości mlecznej z uwzględnieniem kolejności i stadium laktacji. Mimo, iż Autorka

podaje, że podziału na stadia dokonano na podstawie przebiegu laktacji proponuję, aby przygotowując pracę do publikacji zamieścić informację o długości ich trwania. Również w tabeli 1 należy doprecyzować zapis dotyczący laktacji VI, gdyż wcześniej zamieściła informację, że ze względu na małą liczbę zwierząt analizowała łącznie laktację 6., 7. i 8. jako jedną klasę.

W części opisowej metod laboratoryjnych brak informacji jakiej długości (pz) były amplifikowane fragmenty analizowanych *microRNA* i z użyciem jakich enzymów restrykcyjnych rozpoznawano polimorfizm, gdyż Autorka na str. 51 podaje jedynie informację, iż fragmenty restrykcyjne rozdzielane były w 2 % żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

Rozdział **Wyniki** Autorka zamieściła na 32 stronach i podzieliła na 5 podrozdziałów, w których kolejno omawia uzyskane rezultaty zgodnie z zakładanymi celami badań. Obszerne wyniki badań zestawiała na 16. wykresach, 3. tabelach znajdujących się w tekście pracy i 12. tabelach stanowiących aneks do części wynikowej pracy. Uzyskane wyniki są interesujące i mają wartość poznawczą. Na szczególne podkreślenie zasługuje dobrze opracowana graficzna prezentacja wyników, która bez trudu pozwala czytelnikowi zapoznać się z dużą dawką informacji zamieszczonej w tej części pracy. Konstrukcja oraz objaśnienie zestawień tabelarycznych i rysunków są informatywne i nie wymagają korekty redakcyjnej. Mam jednak uwagi dotyczące pierwszego podrozdziału, w którym opisuje frekwencję genotypów i alleli dwóch spośród pięciu badanych *microRNA*, jako rezultat rozpoznanego polimorfizmu, natomiast w trzech pozostałych występował monomorfizm. Szkoda, że ten podrozdział nie został wzbogacony fotografiami amplifikowanych produktów PCR i analizy restrykcyjnej z podaniem informacji o długości uzyskanych fragmentów w przypadku *microRNA*, u których stwierdzono polimorfizm.

Kolejnym rozdziałem jest dyskusja. Obejmuje ona 5 podrozdziałów, zamieszczona została na 13. stronach maszynopisu. Redakcja tej części dysertacji wskazuje na znajomość piśmiennictwa światowego z zakresu prowadzonych badań. Muszę zwrócić jednak uwagę, że przedstawiana dyskusja ze względu na brak podobnych badań ma bardziej charakter przeglądu literatury niż krytycznej interpretacji wyników własnych analiz w kontekście rezultatów uzyskanych przez innych autorów.

Rozprawa zakończona jest rozdziałem Podsumowanie i wnioskami. Zamieszczone uogólnienia i wnioski wynikają z założonego celu i zawartych w nim zadań badawczych.



Na ogół zamieszczone w 9 punktach informacje stanowią podsumowanie uzyskanych wyników.

### **Podsumowanie**

Reasumując stwierdzam, że praca doktorska mgr Kai Prüffer pt. ***Polimorfizm wybranych miRNA związanych z odpornością na mastitis*** jest cenną, nowatorską i perspektywnie ważną pozycją piśmiennictwa naukowego. Wnosi oryginalne wyniki, istotnie poszerzające wiedzę z zakresu roli *microRNA* w procesach odpornościowych krów ma *mastitis* oraz mogą być powiązane z cechami użytkowości mlecznej. Wartość rozprawy powiększa fakt, iż uwzględniona grupa krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej utrzymywana była w jednolitych warunkach środowiskowych. Z pewnością będzie to cytowana pozycja literatury naukowej. Zakres przeprowadzonych analiz świadczy o znajomości problematyki badawczej oraz umiejętności stosowania metod badawczych i analiz statystycznych do opracowania wyników. Zgromadzone informacje z zakresu genetyki molekularnej i statystyki umiejętnie powiązane ze sobą są niewątpliwie walorem rozprawy. Wymienione w recenzji uwagi mają wyłącznie charakter porządkowy i nie obniżają ogólnej, pozytywnej oceny merytorycznej opracowania.

### **Wniosek końcowy**

W posumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska autorstwa mgr Kai Prüffer pt. ***Polimorfizm wybranych miRNA związanych z odpornością na mastitis***, stanowi oryginalne opracowanie problemu naukowego i spełnia wymogi określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789 z póź. zm.) oraz w przepisach wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z póź. zm.). W związku z tym przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wniosek o przyjęcie pracy doktorskiej mgr Kai Prüffer bez zastrzeżeń i dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Urszula Czarnik

