

Prof. dr hab. Joanna Barłowska
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Kai Prúffer
pt. „Polimorfizm wybranych *miRNA* związanych z odpornością na *mastitis*”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Katarzyny Wojdak-Maksymiec prof. ZUT
w Katedrze Genetyki

Podstawa formalna

Recenzję przygotowano w związku z pismem Pana dr hab. inż. Arkadiusza Pietruszki, prof. ZUT, Dziekana Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (nr pisma: WBiHZ/67/2023).

Znaczenie podjętych badań

Mastitis jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych i kosztownych chorób krów mlecznych na całym świecie. Straty generowane przez przypadki zapalenia wymienia wynikają głównie ze zmniejszonej produkcji i pogorszenia jakości mleka, zwiększonych nakładów pracy i wydatków na leczenie, a także częstszego brakowania krów. Koszty związane te różnią się w zależności od czynnika etiologicznego, przebiegu stanu klinicznego, cen mleka i zwierząt, pasz, usług i leków. W różnych krajach koszty te są zróżnicowane, aczkolwiek za każdym razem są dużym obciążeniem finansowym w gospodarstwach mlecznych. Rollin i współautorzy (2015) podają, że przeciętny przypadek klinicznego zapalenia wymienia w stadzie bydła mlecznego utrzymywanego w USA powodował całkowity koszt ekonomiczny w wysokości 444 USD, w tym 128 USD przypadało na koszty bezpośrednie i 316 USD na pośrednie. Koszty bezpośrednie obejmowały diagnostykę (10 USD), leczenie (36 USD), mleko nienadające się do sprzedaży (25 USD), usługi weterynaryjne (4 USD), pracę (21 USD) i przypadki śmiertelne (32 USD). Koszty pośrednie obejmowały przyszłe straty w produkcji mleka (125 USD), przedwczesny ubój i straty związane z odtworzeniem (182 USD) oraz przyszłe straty reprodukcyjne (9 USD). W warunkach polskich straty wynikające z wystąpienia przypadku klinicznego *mastitis* w stadzie szacuje się średnio na 100-200 zł za odrzucone mleko, a kolejne na 100-500 zł wynika z leczenia.

Stany zapalne wymienia powodowane są przez ponad 140 różnych typów drobnoustrojów bytujących zarówno na zwierzęciu, jak i w jego środowisku. Przyczyną stanów zapalnych wymienia mogą być bardzo różnorodne drobnoustroje, takie jak: bakterie, mykoplazmy, grzyby drożdżakopodobne, algi i w rzadkich przypadkach wirusy. Jednak u krów mlecznych najczęstszą przyczyną choroby są bakterie. Rolę dominującą w wywoływaniu zapaleń wymienia mają gronkowce złociste i paciorkowce

bezmleczności oraz środowiskowe, tj. *E. coli* i inne *coli*-podobne. Leczenie stanów zapalnych wymienia klasycznymi antybiotykami coraz częściej utrudnione jest obecnie faktem zwiększającej się lekooporności bakterii.

Podatność czy też odporność na zapalenie wymienia krów mlecznych ma podłoże genetyczne. Jednakże zaobserwowany został antagonizm genetyczny pomiędzy wydajnością mleka i stanem zdrowotnym wymienia, polegający na pogarszaniu stanu zdrowia wymienia w efekcie prowadzenia selekcji na wzrost wydajności mleka. Choroba ta jest zatem problemem w stadach wysoko produkcyjnych, w których stosowane są warunki chowu intensywnego. Dlatego też obecnie głównym zadaniem nauki jest poszukiwanie takiego narzędzia, które pozwoli na poprawę stanu zdrowia wymienia krów przy równoczesnym utrzymaniu wysokiej produkcji mleka, będącej warunkiem opłacalności chowu krów mlecznych. Jednym z nich jest selekcja wspomagana markerami genetycznymi lub selekcja genomowa w kierunku zwiększenia odporności na *mastitis*. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) w genach związanych z odpornością immunologiczną mogą być takim użytecznym markerem we wczesnym wykrywaniu przypadków *mastitis* u bydła mlecznego.

Podjęte zatem przez Panią mgr Kaję Prúffer badania, mające na celu odnalezienie związków pomiędzy odpornością/podatnością na *mastitis* (wyrażoną jako liczba komórek somatycznych w mleku), dobową wydajnością mleczną, procentową zawartością białka i tłuszczu w mleku a genetycznymi wariantami genów zaangażowanych w procesy immunologiczne – *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e* są w pełni zasadne, gdyż poszerzają wiedzę na temat ewentualnego wykorzystania tych genów jako markerów odporności na *mastitis* w selekcji i ich wpływu na wydajność bydła mlecznego.

Ocena formalna

Rozprawę doktorską przygotowano w postaci zwięzłego 132-stronicowego manuskryptu, składającego się z 11 rozdziałów, tj. streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, przeglądu piśmiennictwa, celu pracy, materiału i metod, wyników, dyskusji, podsumowania i wniosków, bibliografii oraz aneksu, w którym zawarto część tabel z wynikami badań doktorantki. W pracy zamieszczono 17 tabel oraz 17 wykresów. W wykazie piśmiennictwa zamieszczono 211 pozycji piśmiennictwa związanego z tematyką pracy. Należy zaznaczyć, że 73% pozycji piśmiennictwa to prace opublikowane w ostatnim 15-leciu. Starsze pozycje literatury, Doktorantka uwzględniła w pracy, w celu przedstawienia czytelnikowi rysu historycznego postępu badań genetycznych na świecie.

Ocena merytoryczna

W mojej opinii **tytuł pracy** nie w pełni odzwierciedla treści w niej zawartych, gdyż nie wskazuje na to, że oprócz identyfikacji wariantów genetycznych wytypowanych genów, próbowano również określić ich związek z odpornością/podatnością na *mastitis* i produktywnością krów.

Wstęp jest krótkim i zwięzłym wprowadzeniem czytelnika w problematykę pracy.

Przegląd piśmiennictwa jest natomiast dość obszerny, w którym Autorka począwszy od zdefiniowania terminu „*mastitis*”, przechodzi do opisanego jego objawów w postaci klinicznej i podklinicznej, zmian w składzie chemicznym mleka, patogenów wywołujących tę chorobę oraz metod jej diagnozowania. W dalszej kolejności opisuje mechanizmy odpowiedzi immunologicznej oraz szczegółowo czynniki genetyczne związane z występowaniem *mastitis*, ostatecznie koncentrując się na przedstawieniu dostępnych informacji dotyczących genów uwzględnionych w badaniach. Można dyskutować, czy tak obszerne potraktowanie tego problemu, w niektórych przypadkach wykraczających poza zakres realizowanych badań, jest potrzebny? Z drugiej jednak strony wskazuje to na fakt, że Doktorantka dobrze zgłębiła tą problematykę, stosując właściwy dobór pozycji piśmiennictwa. Pokazało to również, że Doktorantka posiada umiejętność logicznego posegregowanie tej wiedzy w sekwencyjnie następujące po sobie grupy tematyczne.

Głównym **celem pracy** było poszukiwanie asocjacji pomiędzy odpornością na *mastitis* u krów mlecznych rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej a genetycznymi wariantami genów *microRNA2467*, *microRNA2489*, *microRNA2313*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e*. Ten syntetycznie sformułowany cel został rozwinięty pięcioma szczegółowo przedstawionymi zadaniami badawczymi, które w pełni zostały zrealizowane.

W rozdziale **Materiał i metody** Doktorantka dokonała opisu materiału badawczego oraz zastosowanych metod analitycznych i statystycznych z reguły w sposób przejrzysty i dość szczegółowy. Dobór oraz liczebność materiału badawczego (664 krowy), zastosowane metody laboratoryjne, w tym wykorzystanie nowoczesnych technik biologii molekularnej pozwoliło w sposób wiarygodny udokumentować zaobserwowane fakty i zależności. W rozdziale tym Doktorantka nie zamieściła jednak informacji o wyrażeniu zgody właściwej komisji etycznej na przeprowadzanie doświadczeń naukowych na zwierzętach. Materiałem badawczym była wszak krew pobierana od żywych zwierząt i taka zgoda jest bezwzględnie wymagana. Uwzględniając w analizach statystycznych takie czynniki jak liczba komórek somatycznych w mleku i kolejna laktacja Doktorantka szczegółowo opisała kryteria podziału na poszczególne grupy, natomiast dla stadium laktacji (3 okresy) nie znalazłam informacji jakie dni były granicznymi w wyodrębnionych okresach. W tabeli 1, prezentującej liczebność krów i próbnych udojów uwzględnionych w analizach nie podano wartości dla trzeciej grupy SCC, tzn. > 400 tys./ml. Ponadto uważam, że używanie w pracy zredagowanej w języku polskim nie powinno się używać angielskiego skrótu SCC (somatic cell count), a LKS – liczba komórek somatycznych.

Rozdział **Wyniki** przedstawiono wraz z tabelami i wykresami. Pozostałe tabele prezentujące wyniki badań zamieszczono w aneksie.

W wyniku przeprowadzonych badań, Pani mgr Kaja Prűffer zidentyfikowała polimorficzne warianty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* oraz stwierdziła

monomorfizm w *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e*. Wykazała statystycznie istotne związki pomiędzy polimorfizmem wybranych genów *microRNA2313* i *microRNA2467* a odpornością/podatnością na *mastitis* wyrażoną jako liczba komórek somatycznych w mleku. Przeprowadzona analiza wykazała istnienie efektów nie tylko addytywnych, ale także dominacyjnych oraz epistatycznych w kształtowaniu zmienności liczby komórek somatycznych w mleku w badanej populacji krów. Stwierdziła również, że oszacowane efekty addytywne, dominacyjne i epistatyczne w odniesieniu do LKS nie są stałe i zmieniają się w zależności od stanu fizjologicznego krowy.

Po lekturze tego rozdziału mam jednak pewne uwagi do podrozdziału „Statystyki opisowe”. Po pierwsze, nie rozumiem dlaczego został tak zatytułowany, a po drugie interpretacja uzyskanych wyników w niektórych przypadkach nie pokazuje zachodzących tendencji lub jest mylna. Takim przykładem jest zdanie zaczynające się w ostatnim wersie na str. 60 „*Ponadto w I laktacji stwierdzono jedną z najwyższych zawartości białka oraz najniższą zawartość tłuszczu*”. Podczas gdy z tabeli 5. wynika, że najwyższa zawartość białka w mleku była u krów w II laktacji (3,63%), natomiast najniższą zawartość tłuszczu stwierdzono w I, V oraz VI i kolejnych. W zdaniu na stronie 61 (wers 1-2), Doktorantka stwierdziła, cytując: „*Najwyższą procentową zawartością tłuszczu charakteryzowały się zwierzęta w II stadium laktacji, natomiast białka w ostatnim stadium*”. Z tabeli 5 wynika natomiast, że najwyższa zawartość tłuszczu i białka w mleku była u krów będących w III stadium laktacji. Zwracam również uwagę, że to nie zwierzęta zawierały tłuszcz i białko, tylko mleko od nich pozyskane. Poza tym szkoda, że w tabeli 5 przy wartościach średnich dla prezentowanych wskaźników mleka dla poszczególnych grup w obrębie analizowanych czynników nie zaznaczono istotności różnic. Uważam, że łatwiej byłoby wtedy zinterpretować Doktorantce zamieszczone tam wyniki. Mam także pytanie, na jakiej podstawie Doktorantka twierdzi, cytując (str. 61, wersy 9-10): „*Trzeba pamiętać, że choć procentowa zawartość tłuszczu i białka pozornie wzrosła, to produkcja białka i tłuszczu w kilogramach już nie*”? Przecież takich wyników w pracy nie zamieszczone. Kolejne zdanie nie powinno się znaleźć w tym rozdziale (str. 61, wers 10-11) cytując: „*Ponadto zmienia się niekorzystnie profil białkowy pociągając za sobą gorszą jakość technologiczną mleka*”. Takich badań Doktorantka również nie robiła i nie ma z tego zakresu wyników.

Rozdział **Dyskusja** według mojej opinii, jest ponownym przeglądem literatury, często wykraczającym poza obszar zrealizowanych badań. W wielu przypadkach ogranicza się do prostego przedstawienia wyników badań innych autorów, często dotyczących innych genów lub procesów zachodzących na poziomie komórkowym. Brak jest natomiast typowej dyskusji, czyli odniesienia wyników własnych do uzyskanych przez innych autorów. Bez wątpienia, dla doktoranta rozdział poświęcony dyskusji wyników jest najtrudniejszy do napisania. Ponadto może to wynikać z faktu, że takich badań na wytypowanych przez Doktorantkę genach było niewiele lub wcale. Uważam, że rozdział ten wymaga przerezegowania i odniesienia się do danych literaturowych dotyczących stricte przeprowadzonych badań.

W rozdziale **Podsumowanie i wnioski**, który zawiera 9 punktów, kilkakrotnie rozbudowanych jeszcze w podpunkty, Autorka odniosła się do postawionego celu i szczegółowych zadań badawczych. W punktach tych zamieściła najważniejsze stwierdzenia wynikające z przeprowadzonych badań. Trzy ostatnie z nich są natomiast pewnego rodzaju uogólnieniami, odnoszącymi się do ewentualnego wykorzystania badanych genów jako markerów w selekcji bydła mlecznego, zasadności zastosowanych modeli statystycznych oraz stwierdzenia, że efekty poszczególnych genów nie są stałe przez całe życie zwierzęcia, ale mogą zmieniać się w zależności od jego stanu fizjologicznego.

Zakładając, że uzyskane wyniki zostaną opublikowane, sugeruję wnikliwsze podejście do ich opisu, dyskusji i podsumowania.

W pracy wykorzystano bogatą i właściwie dobraną literaturę źródłową.

Podsumowanie

W kontekście wymogów ustawowych stawianym pracom doktorskim, które obejmują oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz ogólną wiedzę kandydata z danego zakresu, przedstawiona do oceny praca spełnia te wymagania. Tematyka przedstawionej do oceny pracy wpisuje się w dyscyplinę zootechnikę, a uzyskane wyniki mają wartość poznawczą. Opisane w dysertacji badania zostały przeprowadzone prawidłowo pod względem metodycznym, a Doktorantka wykazała się dużą wiedzą dotyczącą różnych aspektów związanych z *mastitis* oraz czynników genetycznych warunkujących występowanie tej jednostki chorobowej.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty, zarówno pozytywne, jak i krytyczne stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr inż. Kają Prúffer pt. „Polimorfizm wybranych *miRNA* związanych z odpornością na *mastitis*” spełnia warunki określone w art. 13 ust 1 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz. 1789 ze zm.), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dn. 3 lipca 2018 r. - przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm. W Dz. U. z 22 marca 2019 r. poz. 534).

W związku z powyższym przedkładam Senatowi Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wnioski o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Kai Prúffer do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dn. 7 lipca 2023 r.

Prof. dr hab. Joanna Barłowska

