

Poznań, 8.11.2018 r.

Dr hab. Jolanta Komisarek
Katedra Hodowli Zwierząt i Oceny Surowców
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Duszy

pt.: „Związek pomiędzy polimorfizmem genów *CXCR1*, *IL-17A* i *SELL* a zdrowotnością wymienia i użytkowością mleczną krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej”, wykonanej Zakładzie Hodowli Bydła Instytutu Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, pod kierunkiem dr hab. inż. Joanny Makulskiej, prof. UR oraz promotora pomocniczego dr inż. Joanny Pokorskiej

Przedłożoną do oceny rozprawę doktorską stanowią trzy spójne tematycznie oryginalne prace twórcze:

1. Pokorska J., Dusza M., Kułaj D., Żukowski K., Makulska J. 2016. Single nucleotide polymorphisms in the *CXCR1* gene and its association with clinical mastitis incidence in Polish Holstein-Friesian cows. *Genetics and Molecular Research* 15 (2): gmr.15027247 (IF=0,764; 15 pkt. MNiSW)
2. Dusza M., Pokorska J., Kułaj D., Makulska J. 2018. Identification of polymorphism in the bovine interleukin-17A gene and its association with mastitis in Polish Holstein-Friesian cattle. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 42 (4): 346-352 (IF=0,489; 15 pkt. MNiSW)
3. Dusza M., Pokorska J., Makulska J., Kułaj D., Cupiał M. 2018. *L-selectin* gene polymorphism and its association with clinical mastitis, somatic cell score, and milk production in Polish Holstein-Friesian cattle. *Czech Journal of Animal Science* 63 (7): 256-262 (IF=0,955; 25 pkt. MNiSW)

Wymienione publikacje zostały opatrzone zwięzłym, sporządzonym w języku polskim 12-stronicowym opracowaniem, zawierającym przegląd literatury, hipotezę i cel badań, materiał i metody, podsumowanie wyników, uzasadnienie spójności tematycznej przedkładanego zbioru artykułów oraz spis literatury. Do pracy dołączono też wykaz skrótów, oświadczenia współautorów dotyczące ich udziału w powstawaniu publikacji oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Wszystkie publikacje wchodzące w skład dysertacji zostały opublikowane w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports* (JCR) w latach 2016-2018, a ich łączny *Impact Factor* i suma punktów MNiSW (zgodnie z rokiem publikacji) wynoszą odpowiednio 2,208 i 55. W dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem, w jednej pracy - drugim autorem, a Jej deklarowany i potwierdzony oświadczeniami współautorów udział w powstaniu manuskryptów jest wiodący i wynosi 45% (publikacja pierwsza) i 60% (publikacja druga i trzecia). Kandydatka była głównym pomysłodawcą badań, wykonawcą większości analiz molekularnych i statystycznych oraz autorem tekstów publikacji.

Biorąc powyższe pod uwagę uważam, że strona formalna przedstawionej dysertacji nie budzi zastrzeżeń.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Duszy nawiązuje do szeroko prowadzonych w ostatnich latach badań nad markerami genetycznymi zwierząt gospodarskich i ich związkiem z ważnymi cechami użytkowymi. Badania te polegają na wyznaczeniu genów kandydujących w oparciu m.in. o miejsce ich ekspresji lub funkcję kodowanego przez nie polipeptydu, która powinna być związana z procesami fizjologicznymi prowadzącymi do ujawnienia się analizowanej cechy. Następnie metodami statystycznymi szacuje się stopień zależności między zmiennością fenotypową cechy a polimorfizmem wybranego genu. Analiz tego typu przeprowadzono już w Polsce i na świecie bardzo wiele, jednak w większości przypadków wykrytych asocjacji nie udało się potwierdzić w innych badaniach, obejmujących inne rasy i populacje zwierząt lub wykorzystujących inne modele statystyczne. W przypadku bydła, znaleziono zaledwie kilka genów, których polimorfizm wykazuje wyraźny i powtarzalny związek z cechami produkcyjnymi. Należą do nich geny kodujące acylotransferazę diacyloglicerolowa 1 (*DGATI*), receptor hormonu wzrostu (*GHR*) i kappa-kazeinę (*CSN3*), wpływające na wydajność i skład mleka lub jego przydatność technologiczną do produkcji sera, oraz gen miostatyny (*MSTN*, *GDF-8*) o dużym efekcie na stopień umięśnienia zwierząt. Jeszcze większym wyzwaniem jest wykrycie polimorfizmów odpowiedzialnych za zmienność cech nisko odziedziczalnych, takich jak płodność czy podatność na występowanie różnego rodzaju schorzeń.

Doktorantka podjęła się zatem bardzo trudnego zadania identyfikacji markerów genetycznych dla cech użytkowych bydła mlecznego, ze szczególnym uwzględnieniem zdrowotności wymienia. Jako geny kandydujące wybrała gen receptora chemokinowego α (*CXCR1*), interleukiny 17 typu A (*IL-17A*) oraz L-selektyny (*SELL*), w których analizowała odpowiednio sześć, jeden oraz dwa polimorfizmy. Wybór genów uważam za właściwy, gdyż

wszystkie kodują białka uczestniczące w różnych mechanizmach regulacji odpowiedzi immunologicznej. Ponadto, nie przeprowadzono dotąd wielu badań nad ich efektem na podatność krów na *mastitis*. Dotyczy to szczególnie genu *SELL*, którego polimorfizm Doktorantka analizowała w tym aspekcie po raz pierwszy. Natomiast opublikowane wcześniej wyniki dotyczące efektów genu *CXCR1* nie są jednoznaczne. Zasadność podjęcia badań dodatkowo potwierdza fakt, że były one finansowane z projektów MNiSW.

Mastitis jest jedną z najczęściej występujących chorób krów mlecznych i zarazem jedną najczęstszych przyczyn brakowania. Doskonalenie odporności na to schorzenie utrudnia niski współczynnik odziedziczalności cechy oraz fakt, że w większości stad w Polsce (i nie tylko), występowanie przypadków klinicznych nie jest rejestrowane, a najczęściej stosowaną miarą oceny stanu zdrowotnego wymienia jest poziom komórek somatycznych w mleku. Tylko w niektórych krajach cecha ta jest rutynowo monitorowana i uwzględniona w indeksach selekcyjnych. Dlatego z uznaniem należy zauważyć, że Doktorantka jako podstawę identyfikacji krów chorych uwzględniła w swoich badaniach nie tylko liczbę komórek somatycznych mleka (LKS), ale także częstość zachorowań na kliniczną formę *mastitis*. W przypadku genu L-selektyny, analizowała dodatkowo takie cechy produkcyjne, jak wydajność mleczna oraz zawartość w mleku białka, tłuszczu i laktozy. Szkoda jednak, że efekt polimorfizmu *CXCR1* oszacowała tylko dla występowania klinicznych postaci zapalenia wymienia, z pominięciem pozostałych cech, a szczególnie LKS.

Badania zostały przeprowadzone w populacji bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, liczącej 146 krów (gen *CXCR1*) lub 206 krów (geny *IL-17A* i *SELL*). Analizowana próba nie była zatem zbyt duża. Jednak fakt, że krowy pochodziły z jednej fermy i utrzymywane były w jednakowych warunkach środowiskowych mógł w znacznym stopniu poprawić wiarygodność uzyskanych wyników. Do ustalenia genotypów Doktorantka użyła metody PCR-RFLP, a wstępnej identyfikacji miejsc polimorficznych we fragmentach kodujących genów *IL-17A* i *SELL* dokonała na podstawie wyników sekwencjonowania. Wszystkie wykryte w ten sposób polimorfizmy były jednak już wcześniej opisane w literaturze.

Najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań obejmują:

1. Wykazanie statystycznie istotnej zależności między polimorfizmem c.365T>C w genie *CXCR1* a częstością występowania klinicznych form zapalenia wymienia, przy ponad dwukrotnie wyższym ryzyku zachorowania u krów o genotypie CC w porównaniu z genotypem TT (publikacja 1).

2. Wykazanie braku asocjacji między polimorfizmem genu *IL-17A* a liczbą komórek somatycznych w mleku oraz częstością występowania klinicznych postaci *mastitis* (publikacja 2).
3. Wykazanie zależności między polimorfizmem c.165G>A oraz c.567C>T w genie *SELL* a poziomem komórek somatycznych w mleku oraz wydajnością i składem chemicznym mleka, a także bliskiego istotności efektu polimorfizmu c.165G>A na częstość zachorowań na kliniczne zapalenie wymienia (publikacja 3).

Uważam, że badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Duszy dostarczają nowych informacji i rozszerzają wiedzę na temat genetycznego podłoża podatności krów na zapalenie wymienia. Wskazuje na to również fakt, że zostały pozytywnie ocenione przez recenzentów i redaktorów międzynarodowych czasopism naukowych, w których Doktorantka opublikowała swoje wyniki. Lektura rozprawy nasuwa jednak pewne uwagi i wątpliwości, dotyczące przede wszystkim polskojęzycznej części dysertacji:

1. Tłumaczenie skrótu BTA jako bydlęcy autosom (strona 2) uważam za niewłaściwe, ponieważ skrót ten odnosi się również do chromosomów płci X i Y, a wywodzi się od pierwszej litery nazwy rodzajowej i dwóch pierwszych liter nazwy gatunkowej bydła (*Bos taurus*).
2. W rozdziale „Przegląd literatury przedmiotu” brakuje jakiegokolwiek nawiązania do cech związanych z wydajnością i składem mleka, które również były (choć w mniejszym stopniu) przedmiotem prowadzonych badań.
3. Jako cel badawczy, Autorka podała analizę „polimorfizmu wybranych genów związanych z funkcjonowaniem układu odpornościowego (receptora chemokinowego- α , interleukiny 17A oraz L-selektyny) oraz jego wpływu na występowanie stanów zapalnych wymienia i użytkowość mleczną krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej”. Tak ogólnie sformułowany cel nie został w pełni zrealizowany, ponieważ cechy użytkowości mlecznej analizowane były tylko w powiązaniu z polimorfizmem genu L-selektyny. Ponadto, użycie słowa „wpływ” (w celu badawczym oraz w innych fragmentach rozprawy) jest pewną nieścisłością, gdyż metodyka zastosowana w pracy nie pozwala na udowodnienie bezpośredniego oddziaływania poszczególnych polimorfizmów na zmienność badanych cech. Bardziej właściwe określenia, których można by użyć, to związek, zależność lub asocjacja.
4. W opisie materiału i metod, zarówno w polskojęzycznej części dysertacji, jak i w poszczególnych publikacjach wchodzących w jej skład, zabrakło moim zdaniem nieco

- dokładniejszej charakterystyki analizowanych zwierząt, obejmującej np. przeciętną wydajność mleczną krów i średni poziom LKS. Przydatna byłaby również analiza wzajemnych zależności między poszczególnymi cechami w ocenianym stadzie, a szczególnie między LKS a częstością występowania klinicznych postaci *mastitis*.
5. Prowadzone badania skupiały się głównie na analizie fragmentów kodujących genów *CXCR1*, *IL-17A* oraz *SELL*. Można zatem odnieść wrażenie, że Doktorantka poszukiwała przede wszystkim polimorfizmów modyfikujących właściwości białkowych produktów genów. Takim polimorfizmem mogła być zmieniająca sekwencję aminokwasów w syntetyzowanym polipeptydzie substytucja c.365T>C w genie *CXCR1*, o czym Autorka pisze zarówno w polskojęzycznym podsumowaniu wyników na stronie 10, jak i w publikacji 1. W dysertacji brakuje natomiast próby wyjaśnienia mechanizmów potencjalnego oddziaływania polimorfizmów genu *SELL*, które były synonimiczne i nie zmieniały sekwencji kodowanego białka.
 6. Zdanie „Dla pozostałych pięciu polimorfizmów typu SNP (c.+291C>T, c.+816C>A, c.+819G>A, +1093C>T oraz +1373C>A) zidentyfikowanych w obrębie genu *CXCR1* nie wykazano związku z zachorowalnością na *mastitis*” zamieszczone w podsumowaniu wyników na stronie 10 jest nieściśle. Z treści publikacji 1 wynika bowiem, że cztery z wymienionych polimorfizmów nie były uwzględnione w analizie asocjacji z występowaniem zapalenia wymienia ze względu na efekt tzw. nierównowagi sprzężeń.
 7. W spisie literatury kończącym polskojęzyczną część dysertacji (strony 13-15) umieszczono pozycję Radosz i Obuchowicz (2013), do której wcześniej nie odwoływano się w tekście. Brakuje tam natomiast dwóch prac cytowanych na stronie 5 (Pighetti i in., 2012 oraz Verbeke i in. 2012).
 8. Streszczenie pracy w języku angielskim powinno być raczej zatytułowane „*Abstract*” lub „*Summary*”. Proponuję też zastąpić wyrażenie „*value of milk traits*” innym zwrotem, np. „*milk production traits*” lub „*milk yield and composition*”.

Powyższe uwagi wynikają z obowiązku recenzenta i nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej dysertacji. Praca dobrze wpisuje się we wciąż aktualny nurt poszukiwań markerów genetycznych ważnych cech produkcyjnych i funkcjonalnych bydła, wśród których odporność na *mastitis* jest szczególnie istotna. Zastosowane metody dowodzą dobrego opanowania przez Doktorantkę warsztatu badawczego, a przedstawione wyniki stanowią wartościowe uzupełnienie dotychczasowej wiedzy z zakresu prowadzonych badań.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Duszy pod tytułem “Związek pomiędzy polimorfizmem genów CXCR1, IL-17A i SELL a zdrowotnością wymienia i użytkowością mleczną krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej” w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, określonym w ustawie z dnia 14. marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 oraz Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365). Dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Duszy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Jolanta Komisarek