

Streszczenie/Abstract

Wprowadzenie: *Mastitis* to stan zapalny gruczołu mlekowego, który może występować w formie łatwo dostrzegalnych „gołym” okiem objawów klinicznych, jak i subklinicznej postaci diagnozowanej za pomocą pośrednich wskaźników, np. liczby komórek somatycznych w mleku. Choroba jest wywoływana przez drobnoustroje (bakterie, wirusy, grzyby), których obecność w tkankach wymienia krwi wywołuje stan zapalny. Zaobserwowano genetyczne różnice w podatności/odporności na chorobę wśród bydła. Podatność czy odporność na *mastitis* jest cechą wielogenową, której sposób dziedziczenia jest skomplikowany do prześledzenia ze względu na istnienie nieaddytywnych oddziaływań między genami oraz interakcji pomiędzy środowiskiem a genami. Programy hodowlane, mające na celu ograniczenie zachorowalności na *mastitis*, wykorzystuje genetyczne różnice w podatności/odporności na chorobę do poszukiwania markerów genetycznych związanych z zapaleniem gruczołu mlecznego.

W niniejszej pracy zostały przeanalizowane polimorfizmy genów, których produkty związane są z procesem autofagii (*CTSD*, *PRKCQ*, *SH3GLB1*, *BCL2* i *ATG14*). Autofagia jest ważnym procesem, niezbędnym do regulacji odpowiedzi immunologicznej (swoistej i nieswoistej) na infekcje i dlatego można przypuszczać, że polimorfizmy zlokalizowane w genach, których produkty uczestniczą w tym procesie, mogą być związane z odpornością czy podatnością na *mastitis*. Ponadto, w pracy zostały oszacowane efekty nieaddytywne badanych genów, a także prześledzono efekty poszczególnych genów, w zależności od których poziom ekspresji może być zależny od stanu fizjologicznego zwierzęcia.

Cel: Celem pracy było poszukiwanie asocjacji pomiędzy polimorficznymi wariantami genów *CTSD*, *PRKCQ*, *SH3GLB1*, *BCL2* i *ATG14* a odpornością na *mastitis* u krów mlecznych rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, oraz oszacowanie ewentualnych efektów nieaddytywnych między badanymi genami oraz zmienności efektów genów w zależności od czynników środowiskowych.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana od 745 krów, z której wyizolowano DNA i analizowano za pomocą PCR. Zwierzęta były hodowane w identycznych warunkach środowiska. Badane krowy podlegały kontroli użytkowości mlecznej metodą A4. Analiza statystyczna wyników badań została przeprowadzona dla poszczególnych stadiów laktacji (I, II, III), kolejnych laktacji (I, II, III, IV, V i VI) i

Abstract

Introduction: *Mastitis* is an inflammation of the mammary gland, which can occur either in the form of easily visible clinical symptoms or in a subclinical form diagnosed on the basis of indirect indicators such as somatic cell count in milk. The disease is caused by microorganisms (bacteria, viruses, fungi), whose presence in the cow's udder tissues triggers inflammation. It has been found that there are genetic differences in susceptibility/resistance to udder inflammation in dairy cattle. Susceptibility or resistance to *mastitis* is a multi-gene trait, whose inheritance mechanism is difficult to trace due to non-additive interactions between genes and interactions between genes and environment. Cow breeding programmes aimed at reducing the incidence of *mastitis* use genetic differences in susceptibility/resistance to the disease to search for genetic markers associated with udder inflammation.

In this dissertation, I analyse polymorphic variants of genes whose products are associated with the autophagy process (*CTSD*, *PRKCQ*, *SH3GLB1*, *BCL2* and *ATG14*). Autophagy is essential for the regulation of the immune response (both specific and non-specific) to infection and it can therefore be hypothesised that polymorphisms located in the genes whose products are involved in this process may be associated with resistance or susceptibility to *mastitis*. In addition, during my study I estimated the non-additive effects of the analysed genes and examined the effects of the individual genes whose expression levels may depend on the physiological condition of the animal.

Aim: The aim of this study was to search for associations between the polymorphic variants of the *CTSD*, *PRKCQ*, *SH3GLB1*, *BCL2* and *ATG14* genes and resistance to *mastitis* in Black-and-White Holstein-Friesian dairy cows, and to estimate possible non-additive effects between the genes under study and the variability of the gene effects in relation to environmental factors.

Material and methods: The material for the study was peripheral blood collected from 745 cows, from which DNA was isolated and analysed by PCR. The animals were kept under identical environmental conditions and subjected to milk performance testing using the A4 method. The results of the study were analysed statistically for individual lactation stages (I, II, III), subsequent lactations (I, II, III, IV, V and VI) and all lactations combined, and according to the health class of the cow (clinical, subclinical *mastitis*). Additionally, cows suffering from clinical *mastitis* were included in the study. Clinical cases were documented by an experienced veterinarian, who recorded data on the incidence of *mastitis acuta* and

Szczecin, 15.11.2023 r.

Prof. dr hab. Violetta Dziedzicko
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, zatytułowanej: "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 dotyczących 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), kławizny 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 „przegląd 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 użytkowości 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 obszernie 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 badania 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 mastitis 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 punktu 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.

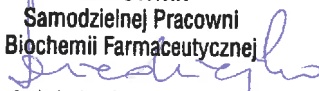
- 1) str. 15 „aktywności dehydratu mleczanu genazy (LDH)” ??? powinno być dehydrogenazy mleczanowej
- 2) str. 37 „kompleksu oksydazy fosforanowej dinukleotydu nikotyn amidowego” – Doktorantka chyba miała na myśli oksydazę NADP(H) czyli oksydazę fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
- 3) sporo 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 Dziedziejko



Dr hab. inż. Wojciech Kruszyński prof. uczelni
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. Chelmońskiego 38C, 51-630 Wrocław

Wrocław, dnia 10.11.2023r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Anny Stanisławczyk

pt. „Asocjacje pomiędzy polimorficznymi wariantami wybranych genów zaangażowanych w procesie autofagii a odpornością na *mastitis* u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej”

Podstawę opracowania recenzji stanowi decyzja Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 20.09.2023 oraz pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo ZUT w Szczecinie Pani dr hab. inż. Małgorzaty Ożgo prof. ZUT z dnia 20.09.2023r.

1. Syntetyczna charakterystyka recenzowanej rozprawy

Promotorem rozprawy doktorskiej jest Pani dr hab. inż. Katarzyna Wojdak-Maksymiec, prof. ZUT.

Przedmiotowa rozprawa doktorska dotyczy problematyki, niezmiernie aktualnej, obejmującej zarówno aspekt badawczy - analiza polimorfizmu genów uczestniczących w autofagii jak i aplikacyjny związany z wpływem tych polimorficznych genów na podatność bydła na *mastitis*. Całokształt pracy ma spójną i przemyślaną strukturę i składa się z:

- 8 zasadniczych i ponumerowanych rozdziałów, w większości rozbudowanych o kilka podrozdziałów,
- 36 tabel zawartych w tekście i 4 tabele w aneksie,
- spisu bibliograficznego zawierającego 316 pozycji literaturowych i opracowań, w tym: 302 pozycje (96%) anglojęzyczne; 180 źródeł (58%) ukazało się po 2010) roku. Wszystkie są ściśle związane z tematem opracowania.
- Całość pracy, zawarta jest na 170 ponumerowanych stronach.

2. Ocena doboru tematu rozprawy

Schorzenie gruczołu mlecznego jakim jest *mastitis* to jedna z podstawowych bolączek w hodowli bydła mlecznego. W związku z tym, że generuje wysokie koszty jest przedmiotem licznych badań. Podłoże tej choroby jest stosunkowo dobrze poznane i zbadane w tym zarówno czynniki środowiskowe jak i uwarunkowania genetyczne. Liczne badania prowadzone nad czynnikami genetycznymi wskazują na wielogenowe i złożone uwarunkowania *mastitis*. Wieloaspektowe analizy sposobu dziedziczenia tej choroby należą do aktualnych problemów badawczych. Jednym kierunków badań nad genetycznymi uwarunkowaniami *mastitis* jest analiza innych niż addytywne oddziaływań między genami. Oprócz aspektu praktycznego analiza epistazy, plejotropii, dopełniającego się działania genów czy też modyfikacji



epigenetycznych niesie bardzo interesujący walor badawczy pogłębiający wiedzę na ten temat. Uwzględnienie w badaniach polimorfizmu genów uczestniczących w autofagii dodatkowo podkreśla unikatowy charakter badań.

W związku z tym, bardzo wysoko oceniam dobór tematu rozprawy doktorskiej, w której Doktorantka podjęła temat związku polimorfizmu genów analizowanych w różnych układach współdziałania biorących udział w procesie autofagii w kontekście odporności bydła na *mastitis*.

3. Ogólna charakterystyka rozprawy

Treść rozprawy doktorskiej została przedstawiona w ośmiu zasadniczych i ponumerowanych rozdziałach, które zostały poprzedzone spisem treści oraz zamieszczonym na końcu rozprawy streszczeniem.

We wstępie - **rozdział pierwszy** rozprawy Doktorantka przedstawiła tło i genezę poruszanych zagadnień. W sposób syntetyczny naświetlony został problem schorzenia, jego znaczenie i etiologia oraz procesy autofagii jako element odpowiedzi immunologicznej potencjalnie związanej z opornością czy podatnością na *mastitis*.

W **rozdziale drugim** Autorka przedstawiła cel główny jakim było zweryfikowanie hipotezy o istnieniu 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. Realizacja planu badawczego została podzielona na siedem logicznie wyodrębnionych zadań badawczych. Zarówno cel główny jak i zadania szczegółowe są właściwe, jasno sprecyzowane, a kolejność ich realizacji uzasadniona merytorycznie.

Kolejny w pracy **rozdział trzeci** – to przegląd literatury jest bardzo obszerny - liczy 36 stron maszynopisu. Autorka w sposób kompleksowy przybliży analizowane zagadnienie. Wychodząc od opisu samego schorzenia poprzez jego diagnostykę, przyczyny, leczenie poprzez konsekwencje po czynniki środowiskowe i genetyczne związane z analizowanym schorzeniem. W przeglądzie piśmiennictwa widać pewną niekonsekwencję. Skoro temat rozprawy jest ściśle związany z aspektami genetycznych uwarunkowań i zależności z *mastitis* to oczekiwać należy że to te aspekty będą główną osią przeglądu piśmiennictwa tymczasem jest to 30% całości tych rozważań. Autorka, mam wrażenie, postawiła sobie ambitny plan uwzględnienia wszystkich pozycji traktujących wieloaspektowo o *mastitis* i w efekcie ten główny aspekt genetyczny uległ częściowemu rozmyciu. Z bardzo dużej liczby (316 pozycji) piśmiennictwa ok 60 % to opracowania po 2010 roku. Z pozostałych, starszych opracowań, oprócz kilkunastu bazowych w tym temacie, bez szkody dla jakości pracy, można by było zrezygnować. Ułatwiłoby to lekturę i uwypukliłoby zasadniczy problem badawczy poruszony w pracy. Należy również zweryfikować spis piśmiennictwa ze źródłami zamieszczonymi w tekście pracy - jedenaście pozycji zostało pominiętych a także pojawiają się błędy w datach publikacji i nazwiskach autorów.

Materiał i metody czyli **rozdział czwarty** został zredagowany typowo dla pracy badawczej. W opisie materiału Autorka scharakteryzowała zarówno zwierzęta które były poddane badaniom (krowy mleczne rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej, ich pochodzenie, warunki utrzymania) jak i źródła informacji o wartościach fenotypowych analizowanych w pracy (dokumentacji hodowlano-



weterynaryjnej). Przedstawiono został również schemat podziału danych według zaplanowanych zadań badawczych. Wybór materiału badawczego uważam za właściwy dla uzyskania celu badań. W trakcie analizy tych informacji pojawiły się pytania wymagające uszczegółowienia. Autorka podaje że 745 krów objętych badaniami pochodziło po 244 buhajach czy to oznacza że w stadzie były osobniki spokrewnione? Nie ma również informacji o poziomie laktacyjnej wydajności mlecznej w tym stadzie a czynnik ten może też wpływać na stopień zachorowalności na *mastitis*. Nigdzie nie ma informacji o liczbie osobników w poszczególnych grupach badawczych tzn. w poszczególnych analizowanych laktacjach, klasach zdrowotności, stadiach laktacji. W tabelach 3 i 4 powinno być chyba zamiast „razem” „średnio”. W opisie metod laboratoryjnych przedstawiono kompletną i właściwą charakterystykę analiz molekularnych i z czystej ciekawości pojawia się pytanie czy wszystkie te analizy doktorantka wykonywała samodzielnie? Kolejnym podrozdziałem tej części pracy jest opis metod statystycznych. W podrozdziale ocena efektów badanych *loci* w sposób nie budzący wątpliwości zostały przedstawione modele uwzględniające efekty addytywne i nieaddytywne dla analizowanych genów i ich układów (jedyna uwaga dotyczy niepotrzebnego powtarzania na stronach 58 i 59 tego samego modelu statystycznego w którym zmienia się tylko analizowany gen. Podrozdział metody statystyczne pozostawia pewien niedosyt. Doktorantka zastosowała, moim zdaniem, właściwe narzędzia statystyczne ale zapis zastosowanego modelu jest nie do końca precyzyjny. W opisie modelu pojawiły się efekty stałe, których nie uwzględniono w modelu np. udziału genów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Podobnie nie do końca precyzyjny jest opis różnych efektów np. YS_m jako efekt klasy roku/miesiąca prawdopodobnie wycielenia w opisie modelu jest z kolei roku/sezonu wycielenia. Ponadto nie podano liczby klas w poszczególnych efektach. Autorka w pracy podjęła się próby analizy asocjacji stanu fizjologicznego krów w trakcie laktacji a efektami poszczególnych układów analizowanych genów. Zadanie to realizowano analizując trzy stadia laktacji. Z opisu materiału i metod badań nie wynika czy analizowano te same osobniki w kolejnych laktacjach podejrzewam że nie ale taka informacja powinna się znaleźć w metodyce. W opisie metod statystycznych nie ma również informacji o programie w jakim wykonywano obliczenia.

Rozdział piąty - wyniki jest najobszerniejszą częścią pracy (liczy 46 stron) a uzyskane rezultaty zaprezentowano w 29 tabelach. Zostały przedstawione frekwencje (tabele 8-10) trzech polimorficznych genów (CTSD, PRKCQ, SH3GLB1) oraz efekty addytywne, dominacyjne i epistatyczne badanych genów w analizowanych układach doświadczalnych tj. do InSCC, dobowej wydajności mleka (raczej nie mlecznej), zawartości tłuszczu, białka, laktozy, suchej masy analizowane w zależności od kolejnej laktacji, stadium laktacji, statusu zdrowotnego (tabele 11-31). W tabelach 29-36 przedstawiono efekty addytywne, dominacyjne i epistatyczne badanych genów w odniesieniu do liczby przypadków *mastitis acuta*, *mastitis chronica*, oba schorzenia łącznie w kolejnej laktacji, w następnych tabelach (32-36) przedstawiono efekty addytywne, dominacyjne i epistatyczne badanych genów w odniesieniu do liczby ćwiartek objętych infekcją, liczby ćwiartko-dni, liczby dni przechorowanych na *mastitis acuta*, *mastitis chronica* i oba schorzenia łącznie w zależności od kolejnej laktacji. Autorka zarówno w sposobie konstrukcji, przejrzystych i przemyślanych tabel, jak i w opisie uzyskanych rezultatów zachowuje konsekwencję dzięki czemu bardzo obszerny materiał jest łatwiejszy do percepcji i wyciągnięcia uogólnień. Na szczególne uznanie zasługuje bardzo umiejętne syntetyczne zaprezentowanie wyników przeprowadzonych badań. W tym miejscu



pojawia się oczekiwanie szerszej i łącznej interpretacji uzyskanych wyników np. efekt sumujący genu CTSD obniża lnSCC i równocześnie podwyższa dobową wydajność mleka. Natomiast autorka skupia się na analizie pojedynczych efektów tymczasem można zaobserwować ich bardziej kompleksowe oddziaływanie. Prawdopodobnie wynika to z bardzo dużej liczby uzyskanych rezultatów.

Dyskusja będąca **rozdziałem szóstym**, licząca jedenaście stron maszynopisu, jest dobrze przygotowaną częścią rozprawy. Autorka w sposób umiejętny przeprowadza porównanie rezultatów swoich badań na tle badań innych autorów. W sposób przejrzysty podzieliła rozdział na cztery logicznie wyodrębnione podrozdziały, w których w sposób uporządkowany i spójny odwołuje się do publikacji opisujących polimorfizmy w genach, których produkty zaangażowane są w proces autofagii, związek autofagii z odpornością i procesami zapalnymi, znaczeniem efektów nieaddytywnych oraz czynników środowiskowych. Wydaje się, że niektóre, wstępne treści w podrozdziale pierwszym lepiej wyglądałyby w piśmiennictwie. Na podkreślenie zasługuje fakt że większość źródeł do których Autorka odnosi się w tej części rozprawy to bardzo aktualne, najnowsze opracowania.

Podsumowanie i wnioski **rozdział siódmy** przedstawione na zakończenie pracy w postaci siedmiu punktów. Stanowią one konglomerat zarówno wniosków (np. punkty 6 i 7) jak i podsumowania (np. punkty 1, 2, 3). Proponuję w trakcie przygotowywania pracy do publikacji wyraźnie rozdzielić te części pracy. Zastanawiam się również nad ostatnim zdaniem szóstego podpunktu wydaje się że w badaniach nie ujawniono mechanizmu dziedziczenia bo to jest znane od czasów Mendla a raczej sposób dziedziczenia analizowanych genów.

4. Ocena merytoryczna rozprawy

Celem rozprawy doktorskiej mgr Anny Stanisławczyk było analiza zależności, w różnych układach, polimorficznych wariantów wybranych genów zaangażowanych w procesie autofagii a odpornością krów na *mastitis* oraz wartościami ich parametrów produkcyjnych w zależności od różnych czynników fizjologicznych. Cel pracy przyjęty przez Doktorantkę jest prawidłowy i właściwie sformułowany. Metodyka postępowania opisana w pracy może znaleźć zastosowanie praktyczne. W przedstawionej dysertacji udowodniono złożoność i istotność podejmowanego tematu. Reasumując stwierdzam, że pod względem merytorycznym rozprawa nie budzi większych zastrzeżeń. Dysertacja przygotowana jest na dobrym poziomie edycyjnym z zastosowaniem nowoczesnych narzędzi. Uwagę zwraca estetyka pracy oraz czytelność i komunikatywność. Układ pracy jest logiczny i przejrzysty, a praca zredagowana poprawnie. Powyższe uwagi nie wpływają na pozytywną ocenę wartości merytorycznej pracy. Stanowi ona cenny dorobek naukowy Autorki w reprezentowanej dyscyplinie naukowej, a jej wyniki są ważne i interesujące zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością zagadnienia i umiejętnością prowadzenia prac naukowych o charakterze analitycznym. Praca wnosi oryginalny wkład do wiedzy z zakresu prowadzonych badań.

5. Podsumowanie i wniosek końcowy



Praca doktorska pt. „Asocjacje pomiędzy polimorficznymi wariantami wybranych genów zaangażowanych w procesie autofagii a odpornością na *mastitis* u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej odmiany czarno-białej” jest ciekawa zarówno pod względem naukowym jak i praktycznym. Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy aktualnych problemów związanych z badaniem związku autofagii i jej uwarunkowań w postaci oddziaływań nieaddytywnych pomiędzy polimorficznymi wariantami genów ją warunkujących i ich asocjacji z odpornością bydła na *mastitis*. Na podstawie przeprowadzonej analizy treści pracy uważam, że Doktorantka dokonała trafnego wyboru tematyki swoich badań, a praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Przedstawiona dysertacja nawiązuje do aktualnej wiedzy i praktyki, wnosząc do niej nowe treści. Cel rozprawy został sformułowany poprawnie, osiągnięty i potwierdzony we wnioskach i podsumowaniu. Przedstawiona przez Doktorantkę metoda badań może mieć właściwości wdrożeniowe, co wpisuje się w ogólną tendencję prowadzonych badań naukowych, związaną z zastosowaniami aplikacyjnymi i wdrożeniowymi. Opiniowana rozprawa jest opracowaniem o dużych walorach poznawczych i ma charakter opracowania naukowego. Przygotowana została starannie i wyczerpująco omawia zastosowany aparat badawczy, przeprowadzone badania i analizy. Zaprezentowane w pracy wyniki badań są unikalne w skali krajowej cenne zarówno z naukowego punktu widzenia, jak i zastosowań praktycznych oraz wnoszą elementy nowej wiedzy w dyscyplinie naukowej biotechnologia. Zgromadzony w ramach realizacji pracy obszerny materiał badawczy może zostać wykorzystany do dalszej analizy naukowej. Autorka pracy – Anna Stanisławczyk wykazała się umiejętnością samodzielnego formułowania i rozwiązywania zadań naukowych na poziomie prac doktorskich i reprezentuje wysoki poziom wiedzy w dziedzinie tematyki rozprawy. W trakcie czytania pracy nasunęły mi się pewne wątpliwości i pytania wymagające wyjaśnienia, które zawarłem w niniejszej recenzji. W moim przekonaniu nie obniżają one pozytywnej oceny pracy. Sformułowane przeze mnie uwagi mogą w części wynikać z odmienności poglądów i różnych ocen omawianych zagadnień, a w części są zachętą do dyskusji w zakresie poruszanych kwestii. Wysoko oceniam poziom rozprawy oraz intelektualny wkład Autorki i nakład włożonej przez Nią pracy.

Biorąc pod uwagę sformułowane powyżej opinie wyrażam jednoznaczne stanowisko, że opracowanie Pani mgr Anny Stanisławczyk pt.: „Asocjacje pomiędzy polimorficznymi wariantami wybranych genów zaangażowanych w procesie autofagii a odpornością na *mastitis* u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyskiej odmiany czarno-białej”, zgodnie z ustawą z o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki zawartych we właściwych przepisach (*art.13 ust.1 ustawy, z dnia 14.03.2003r., tekst jedn. Dz.U. z 2017r. , poz. 1789*), spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim oraz mieści się w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie biotechnologia. Dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kuszyński Wojciech

UCHWAŁA NR 3
Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 19 stycznia 2024 r.
w sprawie nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo
mgr Annie Stanisławczyk

Na podstawie art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.) oraz § 1 ust. 1 pkt 2) uchwały nr 130 Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 29 maja 2023 r. w związku z § 96 ust. 8 Statutu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo uchwala co następuje:

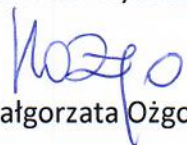
§1

Rada Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie po zapoznaniu się z przebiegiem przewodu doktorskiego postanawia nadać stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo mgr Annie Stanisławczyk.

§2

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodnicząca Rady Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo


dr hab. inż. Małgorzata Ożgo, prof. ZUT

Szczecin, dnia 19 stycznia 2024 r.