

STRESZCZENIE

Jednym z ważniejszych i najbardziej rozpowszechnionych problemów, z którym borykają się hodowcy bydła mlecznego, są infekcje wymienia. *Mastitis*, definiowane jako zapalenie gruczołu mlekowego, jest jednostką chorobową, której zróżnicowane podłoże, nasilenie i wpływ na stan fizjologiczny zwierzęcia zależą od środowiska, czynnika chorobotwórczego i organizmu gospodarza. Mleko z zainfekowanych ćwiartek wymienia jest niezdatne do konsumpcji, co niejednokrotnie prowadzi do dużych strat finansowych ponoszonych przez przemysł mleczarski. Jedną z dróg ograniczenia występowania *mastitis* jest wykorzystanie w pracy hodowlanej różnic w genetycznych skłonnościach do tego schorzenia. Cały czas trwają badania nad poszukiwaniem genów markerowych powiązanych z występowaniem *mastitis*. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) w genach związanych z odpowiedzią immunologiczną, mogą być takim użytecznym markerem we wczesnym wykrywaniu przypadków *mastitis* u bydła mlecznego.

Celem niniejszej pracy było odnalezienie związków pomiędzy odpornością/podatnością na *mastitis* (wyrażoną jako liczba komórek somatycznych SCC w mleku), dobową wydajnością mleczną oraz procentową zawartością białka i tłuszczu w mleku a genetycznymi wariantami genów zaangażowanych w procesy immunologiczne – *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e*.

Badaniami objęto stado liczące 644 krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. W pracy zostały zebrane wyniki z 22 292 próbnych udojów, pochodzące z dokumentacji hodowlanej i dotyczące dobowej wydajności mlecznej, procentowej zawartości białka i tłuszczu oraz liczby komórek somatycznych SCC. Od wszystkich badanych zwierząt została pobrana krew obwodowa, następnie wyizolowano genomowe DNA. Polimorfizm badanych genów *microRNA* – *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e* – identyfikowany był metodą PCR – RFLP. Badane krowy były w laktacji od pierwszej do ósmej. Analizy przeprowadzono osobno dla każdej laktacji, jedynie ze względu na stosunkową małą liczebność w późniejszych laktacjach połączono laktacje 6., 7. i 8. w jedną klasę. Efekty wybranych genów były badane także w trzech kolejnych stadiach laktacji. Ponadto, w badanych próbkach mleka przyjęto trzy klasy wartości poziomu komórek somatycznych: krowy zdrowe $SCC \leq 200$ tys/ml, stan podkliniczny $200 < SCC \leq 400$ tys/ml i krowy chore $SCC > 400$ tys/ml. Podział ten zastosowano ze względu na możliwość występowania odmiennych efektów badanych genów w różnych stanach fizjologicznych.

Uzyskane wyniki zostały opracowane i poddane analizie statystycznej. Określona została struktura genetyczna badanej populacji, tj. frekwencje alleli i genotypów analizowanych genów. Analiza statystyczna uzyskanych wyników objęła także poszukiwania asocjacji pomiędzy klinicznymi przypadkami infekcji a polimorfizmem wytypowanych genów. Modelowanie cech, przeprowadzone z zastosowaniem efektów dominacyjnych oraz efektów epistazy pomiędzy genami, obejmowało 4 kombinacje interakcji (addytywny – addytywny, addytywny – dominujący, dominujący – addytywny, dominujący – dominujący). Efekty były badane w zależności od czynników takich jak kolejna laktacja, stadium laktacji i liczba komórek somatycznych SCC.

W wyniku przeprowadzonej analizy w badanej grupie krów zidentyfikowano polimorficzne warianty genów *microRNA2313* i *microRNA2467* oraz stwierdzono monomorfizm w *microRNA2489*, *microRNA29b-2* i *microRNA29e*. W pracy dowiedziono, że istnieją statystycznie istotne związki pomiędzy polimorfizmem wybranych genów *microRNA2313* i *microRNA2467* a odpornością/podatnością na *mastitis* wyrażoną jako liczba komórek somatycznych w mleku. Co ważne, przeprowadzona analiza wykazała istnienie efektów dominacyjnych oraz interakcji pomiędzy genetycznymi wariantami wytypowanych genów w kształtowaniu zmienności liczby komórek somatycznych w mleku w badanej populacji krów oraz wykazała, że efekty dominacyjne i interakcyjne badanych alleli stanowią ważny element pozwalający kompleksowo ocenić całkowity efekt allelu.

Dokonano szczegółowej analizy asocjacji pomiędzy allelami wybranych genów a liczbą komórek somatycznych w mleku w kolejnych laktacjach, w wybranych stadiach laktacji oraz klasach SCC, jednak na tym etapie badań trudno jednoznacznie, na podstawie uzyskanych wyników, wytypować geny markerowe, których polimorfizm mógłby stanowić podstawę do prowadzenia selekcji mającej na celu ograniczenie występowania *mastitis*, nie zmniejszając jednocześnie wydajności mlecznej i koncentracji zawartych w mleku składników takich jak tłuszcz czy białko. Nadzieje budzi jednak dominacyjny efekt allelu T genu *microRNA2467*, który w każdej laktacji związany był z niższą zawartością SCC w mleku. Wydaje się więc, że selekcja skoncentrowana na zwiększeniu frekwencji allelu T *microRNA2467* mogłaby przynieść zadawalające rezultaty pod kątem obniżenia zawartości SCC w mleku u krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej.

12.04.2023.

Kaja Prüffer

ABSTRACT

One of the most important and widespread problems faced by dairy cattle breeders is udder infections. *Mastitis*, defined as inflammation of the mammary gland, is a disease whose varied underlying causes, severity, and impact on the animal's physiological state depend on the environment, the pathogenic factor, and the host organism. Milk from infected quarters of the udder is unsuitable for consumption, which often leads to significant financial losses incurred by the dairy industry. One way to reduce the incidence of *mastitis* is to use genetic differences in susceptibility to this condition in breeding work. Research is ongoing to identify marker genes associated with *mastitis*. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes related to the immune response can be a useful marker for early detection of *mastitis* in dairy cattle.

The aim of this study was to find associations between immunity/susceptibility to *mastitis* (expressed as somatic cell count (SCC) in milk), daily milk yield, as well as the percentage of protein and fat in milk, and genetic variants of genes involved in immune processes - *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2*, and *microRNA29e*.

The study involved a herd of 644 Polish Holstein-Friesian cows of the black-and-white variety. Results from 22 292 milk yield samples were collected from breeding records and included daily milk yield, percentage of protein and fat, and SCC. Peripheral blood was taken from all animals studied, and genomic DNA was isolated. Polymorphism of the *microRNA* genes studied - *microRNA2467*, *microRNA2313*, *microRNA2489*, *microRNA29b-2*, and *microRNA29e* - was identified by PCR-RFLP method. The studied cows were in lactation from the first to the eighth. The analyses were conducted separately for each lactation, and only due to the relatively small number of cows in later lactations, lactations 6th, 7th; and 8th were combined into one class. The effects of the selected genes were also studied in three successive lactation stages. In addition, the milk samples studied were divided into three classes of somatic cell count values: healthy cows with $SCC \leq 200$ thousand/ml, subclinical state $200 < SCC \leq 400$ thousand/ml, and sick cows with $SCC > 400$ thousand/ml. This division was made due to the possibility of different effects of the studied genes in different physiological states.

The obtained results were analyzed and subjected to statistical analysis. The genetic structure of the studied population was determined, i.e., the frequencies of alleles and genotypes of the analyzed genes. The statistical analysis of the results also included the search for associations between clinical cases of infection and the polymorphism of the selected genes.

The feature modeling, conducted using dominant effects and epistatic effects between genes, included 4 combinations of interactions (additive-additive, additive-dominant, dominant-additive, dominant-dominant). The effects were investigated depending on factors such as subsequent lactation, lactation stage, and somatic cell count (SCC).

As a result of the analysis carried out on the group of cows, polymorphic variants of *microRNA2313* and *microRNA2467* genes were identified, and monomorphism was found in *microRNA2489*, *microRNA29b-2*, and *microRNA29e*. The study demonstrated statistically significant associations between the polymorphism of the selected *microRNA2313* and *microRNA2467* genes and resistance/susceptibility to *mastitis* expressed as the number of somatic cells in milk. Importantly, the analysis showed the existence of dominant effects and interactions between genetic variants of the selected genes in shaping the variability of the somatic cell count in milk in the studied cow population and showed that the dominant and interactive effects of the studied alleles are an important element that allows for a comprehensive assessment of the overall effect of the allele.

A detailed analysis of the associations between the selected gene alleles and the number of somatic cells in milk in subsequent lactations, selected lactation stages, and SCC classes was carried out. However, at this stage of the research, it is difficult to unambiguously identify marker genes based on the obtained results, whose polymorphism could serve as a basis for conducting selection aimed at reducing the occurrence of *mastitis* without reducing milk yield and the concentration of components such as fat or protein in milk. However, the dominant effect of the T allele of the *microRNA2467* gene, which was associated with lower SCC content in milk in each lactation, presents a promising avenue that selection focused on increasing the frequency of the T allele of *microRNA2467* could yield satisfactory results in terms of reducing SCC content in milk in Holstein-Friesian cows.

12.04.2023.
Kaja Prüffer

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 całokształcie 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 trzyczonowym 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 zwrócić 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 perspektywicznie 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

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

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Kai Prűffer
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 z chorobą 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 Prűffer 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 zwartego 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 opisu 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 posegregowania 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 Prüffer 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 zamieszczono. 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 przeredagowania 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

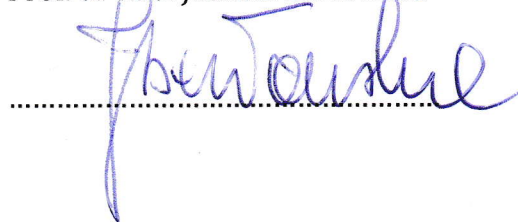
W kontekście wymogów ustawowych stawianym pracom doktorskim, które obejmują oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz ogólną wiedzę kandydata z danego zakresu, przedstawiona do oceny praca spełnia te wymagania. Tematyka przedstawionej do oceny pracy wpisuje się w dyscyplinę zootechnikę, a uzyskane 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 Prűffer 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 Prűffer do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dn. 7 lipca 2023 r.

Prof. dr hab. Joanna Barłowska



UCHWAŁA NR 35
Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 29 listopada 2023 r.

w sprawie nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo
mgr inż. Kai Prüffer

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:

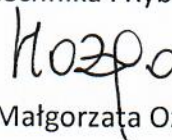
§1

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 inż. Kai Prüffer.

§2

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodnicząca Rady Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo



dr hab. inż. Małgorzata Ożgo, prof. ZUT

Szczecin, dnia 29 listopada 2023 r.