



STACJA BADAWCZA

POPIELNO

STACJA BADAWCZA

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk
12-220 Ruciane – Nida, Popielno 25, NIP 739-05-04-515, REGON 0001289340
tel. 87 423 15 19, www.popielno.pl

Prof. dr hab. Marta Siemieniuch

Popielno, dnia 5.07.2021 r.

Stacja Badawcza Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN,
Popielno 25, 12-220 Ruciane-Nida

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Magdaleny Jankowskiej,

pt.: „Zastosowanie technik biologii molekularnej w ocenie prawidłowości kariotypu młodych koni w Polsce”

Zagadnienia dotyczące płodności i plenności koni, zwłaszcza w aspekcie badania czynników wpływających na pogorszenie wskaźników rozrodu, są niezwykle interesujące z punktu widzenia prowadzenia hodowli i zdrowotności stada. Problemy z zapładnialnością, implantacją zarodka, ronienia oraz niemożność odchowania źrebięcia prowadzą do obniżenia produktywności i znacznych strat ekonomicznych. Dodatkowo konie są zwierzętami długo dojrzewającymi, pierwsze krycie klaczy ma miejsce zwykle w wieku ok. 3 lat, a ciąża zakończona urodzeniem jednego źrebięcia, trwa ok. 11 miesięcy. Z tego względu wartościowym jest oszacowanie już na wczesnym etapie życia, potencjalnej przydatności danego osobnika do rozrodu. Głównymi przyczynami obniżenia płodności są zapalenia błony śluzowej macicy klaczy (*endometritis*), chroniczne degeneracyjne zapalenie błony śluzowej macicy (fibroza), jak również anomalie kariotypu. Nieprawidłowości dotyczące chromosomów płci, najczęstsze spośród anomalii kariotypu u koni, mogą zostać stwierdzone już w okresie źrebięcym. Badania przesiewowe w tym zakresie pozwoliłyby na wyeliminowanie już na wczesnym etapie, osobników nie nadających się do dalszej hodowli i pozwoliłyby na ograniczenie strat ekonomicznych, związanych z kilkuletnim utrzymywaniem osobnika, kosztami zabiegów lekarsko-weterynaryjnych, mających na celu uzyskanie potomstwa od osobnika z aberracjami chromosomalnymi.

Recenzowana praca doktorska liczy w sumie 119 stron maszynopisu, w ramach których zostały zawarte następujące rozdziały: spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, przegląd literatury, cel pracy, materiał i metody, wyniki wraz z graficzną formą ich prezentacji, dyskusja, wnioski oraz piśmiennictwo. Układ pracy jest poprawny, zgodny z ogólnie przyjętymi normami.

Doktorantka podjęła się przeprowadzenia obszernych badań przesiewowych w populacji młodych koni, wykorzystując techniki cytogenetyki molekularnej. Pozwoliło to na zidentyfikowanie nieprawidłowości kariotypu u 3.8% badanej populacji. Materiał badawczy w przedstawionej do oceny rozprawie obejmuje grupę 500 losowo wybranych młodych koni w wieku do drugiego roku życia, należących do 6 ras: czystej krwi arabskiej, konia huculskiego, konika polskiego, konia małopolskiego, konia zimnokrwistego i śląskiego. Materiał do badań pozyskano w różnych ośrodkach hodowlanych, hodowli państwowej jak i terenowej.

Na pierwszych stronach dysertacji Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z historią udomowienia konia oraz bliższą nam, hodowlą koni w Polsce. Doktorantka podkreśla, że hodowla koni w Polsce ma wielowiekową tradycję, w wyniku której powstały różnorodne rasy zachowawcze, tj.: konik polski, hucul, koń wielkopolski i małopolski, koń śląski i konie zimnokrwiste w typie sokólskim i sztumskim. Biorąc pod uwagę stosunkowo krótką historię rasy w odniesieniu do konika polskiego (można przyjąć, że ukierunkowana praca hodowlana w odniesieniu do tej rasy rozpoczęła się w 1921 r. po opublikowaniu artykułu Grabowskiego i Schucha), bardziej odpowiednie byłoby określenie zawarte w Streszczeniu o długoletniej tradycji hodowli koni w Polsce. Następnie Autorka zarysowuje przyczyny niskiego wskaźnika reprodukcyjności u koni, podkreślając, że za główną nieinfekcyjną przyczynę obniżenia płodności u koni uważane są anomalie kariotypu, a wśród nich zaburzenia chromosomów płci. W kolejnych podrozdziałach czytelnik zostaje zapoznany z historią badań kariotypu koni oraz wzorcem kariotypu u tego gatunku, a następnie z charakterystyką mutacji genetycznych. Autorka podkreśla, że mutacje genomowe i chromosomowe są szczególnie niekorzystne w hodowli zwierząt, ponieważ są przyczyną wad rozwojowych, obniżenia płodności lub bezpłodności, a nawet śmierci nosicieli już na wczesnym etapie zarodkowym. Rozdział dotyczący mutacji genetycznych jest bardzo szczegółowo opisany, stanowiąc doskonale źródło usystematyzowanej wiedzy w tym temacie. Schemat 2 zawiera drobny błąd w odniesieniu do segregacji sąsiedniej (jest: 1+4; 3+3, powinno być 1+4; 2+3). Następnie Autorka opisuje w sposób z jednej strony bardzo precyzyjny, a z drugiej bardzo zrozumiały informacje dotyczące nieprawidłowości kariotypu występujące u koni oraz konsekwencje występowania poszczególnych nieprawidłowości na rozwój i funkcjonowanie układu rozrodczego i płodność. W rozdziale tym Autorka używa sformułowania „układ rozrodczy”, które nie jest zgodne z *Anatomicznym mianownictwem weterynaryjnym*, PWRiL, Warszawa 2002. Red. Z. Milart, zgodnie z którym prawidłowym

określeniem jest - narząd płciowy. Kolejny podrozdział opisujący rozwój technik badawczych w ocenie kariotypu jest również bardzo szczegółowy i stanowi swoiste kompendium wiedzy w tym zakresie. Autorka podkreśla, że większość badań opisujących anomalie genetyczne dotyczy koni kierowanych na diagnostykę w związku z obniżoną płodnością lub bezpłodnością, często po wyczerpaniu możliwości tradycyjnego leczenia i zastosowaniu technik wspomaganego rozrodu. Badania Autorki w Polsce poprzedzone były tylko jednymi badaniami przesiewowymi w populacji młodych koni, również obejmującymi grupę 500 osobników, które wykazały występowanie anomalii u 2% zwierząt z badanej grupy (cyt. za Autorką: Bugno i Słota, 2007a; Bugno i in., 2007a). Rola pierwszego rozdziału pracy doktorskiej z jednej strony polega na wprowadzeniu czytelnika bezpośrednio w przedmiot badań, a z drugiej strony jest źródłem informacji o wiedzy i stopniu przygotowania autora do prowadzenia badań w danym kierunku. W mojej ocenie Doktorantka wywiązała się z tych zadań w stopniu bardzo dobrym.

Następnie sformułowano cele badawcze, a przyjęty kierunek badań należy uznać za uzasadniony.

Na wstępie rozdziału Materiał i metody scharakteryzowano materiał badawczy, pochodzący od 500 losowo wybranych młodych koni w wieku do dwóch lat. Autorka podaje, że grupa badawcza składała się z 295 klaczy i 205 ogierków. Niemniej jednak w Tabeli 17 w rozdziale Wyniki, Autorka podaje następujące liczby 296 i 204. Dalej znajduje się opis ras, od których pobrano materiał oraz szczegółowy opis zakładania i prowadzenia hodowli limfocytów. Z rozdziału wynika, że hodowlę limfocytów z komórek krwi obwodowej zakładano na 72 godziny. Po zakończeniu hodowli, komórki poddawano procedurze laboratoryjnej, w wyniku której otrzymywano materiał biologiczny służący do oceny płytek metafazowych, po odpowiednim wybarwieniu. Do identyfikacji chromosomów płci Doktorantka zastosowała technikę FISH. Zastosowane zostały sondy molekularne, komplementarne do fragmentów chromosomu X oraz sonda malująca chromosom Y. Autorka w sposób szczegółowy przedstawia wszystkie parametry przeprowadzonych reakcji, dzięki czemu możliwość ponownego przeprowadzenia podobnych badań wydaje się być całkowicie wykonalna.

Wyniki badań zostały przedstawione na 27 stronach, wliczając w to 17 zdjęć, 6 tabel i 3 wykresy. Wyniki są przedstawione zgodnie z układem doświadczenia. Ilość wyników, podobnie jak ilość wykonanych barwień jest bardzo duża, dlatego na uwagę zasługuje sposób

ich prezentacji zarówno opisowy jak i graficzny. Wyniki przedstawione są w sposób czytelny i zrozumiały z uwzględnieniem analizy statystycznej.

Rozdział Dyskusja jest przykładem dobrej analizy uzyskanych wyników i umiejętności ich konfrontacji z wynikami i spostrzeżeniami prezentowanymi przez innych autorów. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością literatury naukowej w temacie swoich badań, która umożliwiła jej przeprowadzenie rzetelnej i obszernej dyskusji w niniejszej rozprawie doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje dobry dobór metod badawczych, którymi posłużyła się Doktorantka w celu rozwiązania zaproponowanego zagadnienia, jak również trafność wyciąganych wniosków. Zgodnie z oczekiwaniami Autorki, po analizie wcześniejszych wyników badań, monosomia chromosomu X stanowiła najczęściej występującą aberrację kariotypu. Doktorantka dokładnie opisuje następstwa wynikające z braku chromosomu X i porównuje zaburzenia z tym związane u klaczy do ludzi i innych gatunków zwierząt. Następnie Doktorantka opisuje aberrację w postaci trisomii chromosomów płci w postaci mozaiki w układzie dwóch i trzech linii komórkowych. Jak podaje Autorka, frekwencja aberrentnych linii komórkowych nie przekraczała 5%. Doktorantka podkreśla, że z racji na wiek zwierząt, nie przeprowadzono badania narządu płciowego, jak również nie poddano ich kryciu. Z tego względu trudno określić rzeczywisty wpływ zaobserwowanych aberracji chromosomalnych na płodność zwierząt poddanych badaniu. Niemniej jednak, w oparciu o dane z piśmiennictwa i wcześniejszych badań, trzeba stwierdzić, że powinno się eliminować zwierzęta obarczone aberracjami chromosomalnymi z hodowli. Następnie Doktorantka szczegółowo przedyskutowała zagadnienie odwrócenia płci, które stanowi również istotną pod względem częstości występowania nieprawidłowość kariotypu u koni. Bardzo ciekawa dyskusja dotyczy zagadnień translokacji wzajemnych. Należy pogratulować Autorce zdiagnozowania przypadku translokacji wzajemnej jednego z chromosomów X z chromosomem autosomalnym u klaczy rasy huculskiej.

Ostatni podrozdział Dyskusji poświęcony jest czynnikom wpływającym na urodzenie potomstwa z aberracjami chromosomalnymi. W mojej ocenie warto byłoby rozszerzyć nieco zawartość wymienionych rozdziałów. W pracy doktorskiej Autorka nie stwierdziła wpływu wieku i rasy na występowanie aberracji chromosomalnych, ale wnioskuje że skoro proces gametogenezy jest podobny u ssaków i stwierdzono zależność zwiększania się odsetka wad genetycznych z wiekiem u ludzi, to celowym byłoby zbadanie takiej zależności na większej populacji koni. Należy przytoczyć tu obserwacje poczynione u koników polskich, żyjących w warunkach rezerwatowych, półwolnościowych, które pozostając w tabunie do końca życia,

wydają potomstwo do wieku około 27-28 lat. Fenotypowo potomstwo tych matek nie różni się od rówieśników, ale przypuszczam, że warto takie osobniki poddać badaniu w kontekście obecności aberracji chromosomalnych.

Ocena końcowa: Przeprowadzone badania wymagały od Doktorantki dużego zaangażowania organizacyjnego i opanowania w wysokim stopniu trudnych, pracochłonnych i żmudnych technik badawczych. O ogromie pracy włożonej w realizację postawionych sobie zadań badawczych świadczy nie tylko obszerny i skomplikowany warsztat ale również znajomość bardzo aktualnej i dobrze dobranej literatury, która zamknęła się w 333 pozycjach. Na podkreślenie zasługuje bardzo precyzyjny, a zarazem zrozumiały język jakim praca została napisana.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska w postaci monografii naukowej jest spójnym i bardzo dobrze przedstawionym materiałem naukowym. Uwagi, bądź zapytania, które mam do Doktorantki są następujące:

1. Przytoczone przez Autorkę wyniki badań własnych oraz poprzednio wykonane przesiewowe badania cytogenetyczne wskazują, że w losowo wybranej grupie koni odsetek osobników z wadami kariotypu wynosi kilka %. Proszę (w przybliżeniu) o podanie kosztów tego typu badań w stosunku do pojedynczego osobnika. Czy widzi Pani szansę na upowszechnienie tego typu badań w populacji młodych koni w Polsce? Czy w innych krajach stosuje się podobne badania przesiewowe na szeroką skalę?
2. Rasy koni objęte przez Panią badaniami należą do ras rodzimych (poza końmi arabskimi). Zwłaszcza w przypadku koników polskich faktem jest oparcie współczesnej populacji na bardzo ograniczonej liczbie osobników, które pierwotnie rasę tę tworzyły. Ponadto, od 1984 r. Księga Stadna koników polskich jest księgą zamkniętą, co uniemożliwia wprowadzenie osobników dotychczas nie ujętych w Księdze. Czy w przypadku tej rasy nie podziewała się Pani większego udziału osobników obarczonych aberracjami chromosomalnymi w porównaniu do innych ras? Czy może Pani zaproponować wytłumaczenie nieobecności aberracji u koni rasy małopolskiej i śląskiej?
3. Proszę o wyjaśnienie ilości zwierząt w grupie klaczy i ogierków.
4. Z recenzenckiego obowiązku muszę wspomnieć, że moją uwagę zwróciła dość duża obecność drobnych błędów, tzw. literówek i błędów interpunkcyjnych, które zakłócają nieco odbiór pracy (np. na stronach: 17 L11 i 26; 21 L3; 25 L12,13,16,32; 31 L 16; 37 L14; 49 L1;

54 L9 i 10; 55 L 21 i 23; 57 L 16; 70 L2; 71 L20; 72 L7 i 27; 74 L22 i 23-powinno być Klinefeltera; 84 L2 i 3;). Te drobne błędy oczywiście nie umniejszają wartości merytorycznej pracy.

Praca doktorska pani mgr Magdaleny Jankowskiej pt.: „Zastosowanie technik biologii molekularnej w ocenie prawidłowości kariotypu młodych koni w Polsce” w mojej ocenie w pełni odpowiada wymogom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w zakresie sztuki *(Dz. U. Nr 65 z 2003 r., poz. 595* z późniejszymi zmianami) stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora. Dlatego też przedkładam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Zootechniki-Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Magdaleny Jankowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Marta Siemieniuch