

Paweł SYSA, prof. n. wet.

Toruń, dnia. 30 lipca 2021 r.

Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

87-100 TORUŃ, ul. Lwowska 1

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt. **„Zastosowanie technik biologii molekularnej w ocenie prawidłowości kariotypu młodych koni w Polsce”**, autorstwa mgr **Magdaleny JANKOWSKIEJ**. Badania wykonano w Instytucie Zootechniki – Państwowym Instytucie Badawczym w Krakowie, pod opieką promotora Pani **Profesor dr hab. Moniki Bugno-Poniewierskiej**

Przedstawiona do oceny rozprawa naukowa pt. „Zastosowanie technik biologii molekularnej w ocenie prawidłowości kariotypu młodych koni w Polsce”, wykonana została w ramach postępowania mającego na celu uzyskanie stopnia doktora nauk przez Panią mgr Magdalenę Jankowską. Badania zostały wykonane w Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt w IZ-PIB pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. Moniki Bugno-Poniewierskiej. Pani Profesor jest najwyższej klasy specjalistką w Polsce w zakresie cytogenetyki koni. Jej pozycja naukowa i publikacje są szeroko znane i cenione w świecie. Daje to, już w założeniu, gwarancję tego, że kierowane przez Nią badania dostarczą nowych, interesujących i ważnych ustaleń. Tak też widzę otrzymany raport naukowy, przekazany mi do oceny, jako podstawy nadania stopnia naukowego doktora. Opracowanie to przestudiowałem z wielką uwagą i ciekawością.

Rozprawa pt. **„Zastosowanie technik biologii molekularnej w ocenie prawidłowości kariotypu młodych koni w Polsce”** została opracowana w klasycznej formie prezentacji prac doktorskich. Całość poprzedzona została *„Spisem treści”* oraz dwoma krótkimi streszczeniami, w języku polskim i angielskim. W syntetycznie zaprezentowanym *„Przeglądzie literatury”* Autorka zawarła, podstawowe informacje na temat postępu wiedzy w zakresie cytogenetyki koni. Sygnalizowane w rozdziale *„Cel pracy”* zamiary wskazywały na podjęcie wątków poznawczych i aplikacyjnych w odniesieniu do występowania patologii chromosomowej, w aspekcie populacyjnym, wśród ras koni hodowanych w Polsce. Rozbudowany rozdział *„Materiał i metody”* zawarł szczegółowo wypunktowane opisy zarówno pochodzenia materiału poddanego badaniom jak i precyzyjnie omówione zastosowane cytogenetyczne procedury diagnostyczne. Relatywnie rozbudowane zostały opisy uzyskanych *„Wyników”* oraz *„Dyskusja”* nad uzyskanymi wynikami. Zgłoszono sześć *„Wniosków”* wynikających z przeprowadzonych badań molekularnych kariotypów koni. Przywołano niezwykle bogatą cytowaną w pracy *„Literaturę”* tematu, wykorzystującą 330 źródeł informacji. Całość opracowania wzbogacona została dokumentacją

ilustracyjną wmontowaną w stosownych miejscach tekstu. Obejmują one: 19 zdjęć fotograficznych (przede wszystkim mikroskopowych zdjęć chromosomów) oraz „zestawienie” zdjęć prawidłowych chromosomów X oraz nr 1 a także i ich rearanżacji, u jednego z diagnozowanych koni. Zaprezentowano nadto 3 schematy, 23 tabele i 3 wykresy. Cała rozprawa została przedstawiona łącznie na 119 stronach wydruku komputerowego.

Do wydrukowanej rozprawy dołączono jej wersję elektroniczną, umożliwiającą recenzentowi i czytelnikowi precyzyjniejszą ocenę detali zdjęć mikroskopowych chromosomów analizowanych z użyciem różnych procedur wizualizacji.

W przeprowadzonych badaniach cytogenetycznych znacznej grupy, 500 osobników, młodych koni różnych ras, obu płci, postanowiono dokonać oceny występowania nieprawidłowości ich kariotypu. Dotychczas nikt nie podjął się przesiewowej analizy cytogenetycznej tak licznej populacji losowo wybranych koni, z wykorzystaniem metod biologii molekularnej. Posługując się prostszymi technikami prążkowymi wykrywano dawniej nosicielstwo nieprawidłowości tła chromosomowego w populacji koni rzędu z częstością ok. 2 %. Wiele publikacji dokumentowało wcześniej związek występowania zaburzeń płodności osobników, a nawet całkowitej bezpłodności, spowodowany nieprawidłowym statusem ich kariotypów. Przywołany we wstępie rozprawy opis postępu diagnostyki genetycznej wskazał na rosnące możliwości precyzyjniejszego rozpoznawania zmian kariotypu nawet w przypadku nikłego odsetka nieprawidłowych komórek. Wcześniejsze badania Bugno-Poniewierskiej i wsp. (2014) wykazały występowanie wśród plemników nasienia ogierów niezwyklej gamy patologicznych zestawów chromosomów oraz korelacji odsetka patologicznych plemników z wiekiem osobnika. Świadczą one dobitnie o błędach przebiegu procesu mejozy w spermatogenezie, choć w nieznacznym odsetku komórek, u tych w pełni prawidłowych ogierów. Zmieniona, nieprawidłowa kompozycja chromosomów w plemniku, który losowo ma szansę uczestniczyć w akcie zapłodnienia, prowadzić będzie do wcześniejszego zamarcia embrionu względnie do wystąpienia u niego zaburzeń rozwojowych w okresie postnatalnym, również prowadzących do eliminacji takiego osobnika z hodowli. Świadomość biologicznych uwarunkowań do osiągnięcia przez konie zdolności do rozrodu dopiero w późnym wieku, zarówno ogierków jak i klaczek, a także stwierdzanie przypadków nieprawidłowego kształtowania się wewnętrznych narządów rozrodczych, nawet u prawidłowo rozwiniętych eksterierowo osobników, wskazują na potrzebę wczesnego rozpoznawania statusu genetycznego młodych koni aby właściwie ukierunkować ich dalsze przeznaczenie hodowlane.

Mając na uwadze wspomniane okoliczności należy uznać, że podjęcie przez Doktorantkę tak ukierunkowanych badań było wysoce zasadne i rokujące uzyskanie ważnych poznawczo i aplikacyjnie informacji.

Do oceny kariotypu badanych koni wykorzystano hodowle limfocytów krwi obwodowej. Warto tu zwrócić uwagę Autorce rozprawy, że tradycyjnie nazywana „żyła jarzmowa”, z której uzyskiwano krew, ma swą prawidłową nazwę anatomiczną jako „żyła szyjna zewnętrzna” (*vena jugularis externa*). Do analizy chromosomów metafazowych wykorzystywano procedury prowadzące do wystąpienia obrazu prążków G (techniką GTG) dającego podstawę do klasyfikacji poszczególnych chromosomów według obowiązującego standardu kariotypu konia. Uzyskanie natomiast pewności precyzji identyfikacji szczególnych fragmentów chromatyd czy rozpoznania obecności dodatkowych, choć w nieznacznym odsetku występujących linii komórkowych (również komórek znajdujących się w okresie międzypodziałowym), posłużyły procedury technik biologii molekularnej. Pozwalają one na wyznakowywanie obecności określonych obszarów chromatyd poszczególnych chromosomów a nawet konkretnych markerów czy wybranych genów poprzez wykorzystanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Należy podkreślić wielką staranność Doktorantki we wdrażaniu procedur molekularnych, w tym przygotowaniu stosownych sond i ich oczyszczaniu a następnie prowadzeniu procedury hybrydyzacyjnej sond z chromosomami. Ze względu na konieczność analizy genomu niektórych koni, z podejrzeniem nieprawidłowości rozwoju i funkcji układu rozrodczego, badania poprowadzono pod kątem występowania u nich genów SRY i ZFY, determinujących czy związanych z ich płcią, koniecznym było izolowanie genomowego DNA i przeprowadzenie technik PCR i PCR-RFLP, dla potwierdzenia obecności danych genów w komórkach osobników problematycznych z punktu widzenia determinacji ich płci.

Dysponując zróżnicowanym materiałem zwierzęcym i zdiagnozowanymi kariotypami młodych koni należących do 6 ras, stanowiących grupy klaczek i ogierków, zdecydowano sprawdzić czy w tych subpopulacjach uda się wykazać predyspozycje rasowe do wystąpienia nieprawidłowości kariotypu. Było to założenie zasadne, jako że znana jest predyspozycja gatunkowa do określonego typu aberracji kariotypu: u bydła występowania fuzji centromerowych, u koni – monosomii X, u świni – translokacji wzajemnych a u człowieka zależności np. wieku matki i zespołu trisomii 21, 18 czy 13, u jej dziecka. Dlatego wykorzystano analizę statystyczną dla sprawdzenia powyższych skłonności rasowych do wystąpienia aberracji kariotypu w grupach koni badanych ras.

Większość przebadanych młodych koni była nosicielami prawidłowego kariotypu, zgodnego z eksterierem, 64,XX względnie 64,XY. Technika molekularną potwierdzano obecność markerów

genów właściwych chromosomów płci. U 18 klaczek i jednego ogierka stwierdzono nieprawidłowe kariotypy. Tak więc, w przebadanej populacji koni wystąpienie nieprawidłowego kariotypu stwierdzono u 3,8 % osobników. Ten wyższy odsetek obciążonych nieprawidłowościami osobników, aniżeli dotychczas sygnalizowano w piśmiennictwie, przypisać należy zdecydowanie precyzyjniejszej, molekularnej technice analizy genomu koni. Jest to ważne osiągnięcie Doktorantki, która wykorzystwała nowe możliwości metodyczne. Tylko u jednej eksterierowo (!) klaczy wszystkie komórki ujawniły obecność jednej postaci kariotypu, tj. 64,XY. Wszystkie pozostałe patologiczne przypadki były obciążone nieprawidłowymi kariotypami w formie złożonej, mozaikowej. Tak jak sygnalizowało to światowe piśmiennictwo, najczęstszą aberracją w badanej populacji było wystąpienie monosomii X w formie mozaiki, reprezentowanej przez dwie lub większą liczbę linii komórkowych, o różnych zestawach chromosomowych. Szczególnie interesującym przypadkiem była klacz, u której doszło do wzajemnej wymiany ramion chromatyd między chromosomem autosomalnym nr 1 a chromosomem płci X. Jest to pierwszy taki przypadek notowany w światowej literaturze, nadzwyczaj ciekawy ze względu na szansę śledzenia jej dalszych losów i przyszłej aktywności układu rozrodczego. U tej młodej klaczy przeprowadzono dodatkowe badania ultrasonograficzne, które wykazały nieprawidłowości budowy układu płciowego, w tym brak jednego jajnika i rogów macicy. Podobnie nadzwyczaj ciekawy, z medycznego punktu widzenia, jest przypadek klaczy o kariotypie mozaikowym, z delecją ramienia długiego ramienia chromosomu X oraz klaczy będącej nosicielką trzech linii komórkowych, w tym linii prawidłowej, a także linii z monosomią X oraz linii z fragmentem długiego ramienia chromosomu X. Ze względu na młody wiek badanych koni cennymi będą przeszłe informacje o nich, po osiągnięciu okresu pełnej dojrzałości płciowej.

Ciekawe obserwacje notuje Doktorantka odnośnie zależności występowania aberracji kariotypu w zależności od rasy. Wprawdzie grupy koni należących do poszczególnych ras były niezbyt liczne, to już na tym poziomie zarysowały się ciekawe tendencje. Zarówno u koni rasy śląskiej jak i koni małopolskich (łącznie 69 osobników) nie natrafiono na nieprawidłowości kariotypu. U koni ras „prymitywnych”, tj. u koni huculskich i konika polskiego, wystąpiło odpowiednio aż 6,14% i 5,48 % osobników z nieprawidłowym kariotypem. Najwyższy poziom występowania przypadków nieprawidłowego występowania aberracji kariotypu dotyczył koni zimnokrwistych (6,67 %). Wiekowych zależności: matka/ojciec – źrebię a wystąpienia patologii kariotypu nie wykazano, ale gromadzenie danych z tego zakresu będzie bardzo cenne w przyszłych analizach.

Bardzo ciekawy i nadzwyczaj ważny w rozprawie jest rozdział poświęcony dyskusji nad uzyskanymi wynikami. Jest ona poprowadzona interesująco bowiem Autorka nawiązuje do

bogatego piśmiennictwa krajowego i światowego z tego obszaru genetyki, również medycznego. Już we wstępie do ocenianej rozprawy można było przekonać się, że Autorka ma szeroką wiedzę o zagadnieniach, którym zamierzyła poświęcić swe badania. Dała temu wyraz wykorzystując i przywołując w swej pracy 330 pozycji cytowanych źródeł. Wydaje się jednak wskazane rozważenie wprowadzenia do przyszłych publikacji nowszego podejścia do definicji i klasyfikacji klinicznych przypadków u koni obarczonych zaburzeniami kształtowania się płci. Dotyczy to w szczególności tak tradycyjnie utrwalonego w piśmiennictwie genetycznym terminu jak „odwrócenie płci”, gdyż z takim osobnikiem miała Autorka do czynienia w swej pracy. Dla określenia przynależności płciowej osobnika należałoby kierować się zaleceniami „Report on Chicago Consensus Conference, October 2005” „Disorders of sex development: a new definition and classification” (Best Practice and Research Clinical Endocrinology & Metabolism; vol. 22 (1), 119-134, 2008). Chodzi bowiem o precyzyjniejsze określanie natury biologicznej etiologii zaburzenia. Klasycznym przykładem było odejście od klasyfikowania przypadków „zespołu niewrażliwości na androgeny” jako zwanego dawniej mylnie „zespołem feminizujących jąder”.

Podsumowanie swych obserwacji Autorka rozprawy zawarła w 6 wnioskach. Sadzę, że zbędnymi są dwa pierwsze wnioski bowiem twierdzenia w nich zawarte są znane od lat a nie wynikają z nowych własnych ustaleń.

Rozprawa doktorska zawiera wiele specjalistycznych informacji, zrozumiałych dla osób zajmujących się genetyką, ale napisana jest tak obrazowym językiem, że pozwala on każdemu na śledzenie autorskiej narracji.


Ocena końcowa rozprawy

W przedstawionej do oceny rozprawie dokonano badań cytogenetycznych znacznej liczby młodych koni. Realizacja tego zadania wymagała wykorzystania niezwykle żmudnie przeprowadzanych, wzajemnie uzupełniających się różnorodnych metod, zaliczanych do najnowszych osiągnięć biologii molekularnej, dzięki zastosowaniu znakowanych sond DNA. W rezultacie Autorka uzyskała wysoce wartościowe nowe informacje dokumentujące przypadki spontanicznie występujących nieprawidłowości kariotypu w populacji zwierząt tego gatunku. W tych badaniach udokumentowano znaczący wzrost precyzji diagnoz cytogenetycznych, w porównaniu z dotychczasowymi doniesieniami literaturowymi, właśnie w wyniku zastosowania najnowszych procedur molekularnych technik analizy DNA. Badania te pozwoliły rozpoznać nieznane dotąd przypadki aberracji chromosomowych odpowiedzialnych za zaburzenia kształtowania się płci. Dzięki wyższej precyzji diagnostycznej możliwe staje się lepsze interpretowanie ich etiologii. Recenzowana rozprawa rzuca tym samym nowe światło na

możliwości i potrzebę wprowadzenia kontroli cytogenetycznych młodych koni, w ramach programów hodowlanych, wnosząc do nich istotne wskazówki odnośnie efektów ekonomicznych pracy hodowlanej.

Biorąc pod uwagę walory poznawcze przedłożonego mi do oceny opracowania pt. „Zastosowanie technik biologii molekularnej w ocenie nieprawidłowości kariotypu młodych koni w Polsce”, którego to dzieła Autorką jest Pani **mgr Magdalena Jankowska**, uważam, że **spełnia ono całkowicie wymagania stawiane rozprawom doktorskim**, zgodnie w ust. 13. „Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dziennik Ustaw nr 65., z dnia 14 marca 2003 r.). Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Zootechniki - Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Jankowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu nadania Jej naukowego stopnia doktora.

Mając na względzie wysokie walory naukowe ocenianej rozprawy doktorskiej **wnoszę jednocześnie o wyróżnienie powyższej pracy.**



Prof. dr hab. n. wet. Paweł Sysa

Toruń, dnia 30. lipca 2021 r.