



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

Wrocław, dnia 15.11.2023 r.

#### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Aleksandry Garbacz  
pt. „Analiza polimorfizmu w genach potencjalnie odpowiedzialnych za padaczkę idiopatyczną w populacji gończego polskiego”

Podstawę opracowania recenzji stanowi decyzja Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 19.09.2023 oraz pismo dyrektora Instytutu Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie Pana dr hab. Marcina Gołębiowskiego prof. SGGW z dnia 25.09.2023r.

#### 1. Syntetyczna charakterystyka recenzowanej rozprawy

Promotorem rozprawy doktorskiej jest Pani prof. dr hab. Wanda Olech-Piasecka a promotorem pomocniczym dr inż. Zuzanna Nowak-Życzyńska.

Przedmiotowa rozprawa doktorska dotyczy problematyki podłoża genetycznego jednej z poważnych chorób neurologicznych – padaczki idiopatycznej u psów. Podjęty problem jest trudny do analizy ze względu na specyfikę genetycznych uwarunkowań tej choroby u poszczególnych ras psów i stosunkowo nieliczny materiał badawczy jaki jest możliwy do uzyskania. Doktorantka w sposób umiemytny dokonała analizy tego zagadnienia a przedstawiona mi do recenzji praca ma spójną i przemyślana strukturę i składa się z:

- 7 zasadniczych rozdziałów, w większości rozbudowanych o kilka podrozdziałów,
- 15 tabel, 22 wykresów oraz materiałów ilustracyjnych (fotografii (3), schematów (4), dendrogramów (1) i formularzy (1)) zawartych w tekście,
- spisu bibliograficznego zawierającego 147 pozycji literaturowych i opracowań ściśle związanych z tematem opracowania, w tym: 135 (92,0%) pozycji literaturowych zagranicznych, 12 (8,0%) pozycji literaturowych polskich 81 (55%) pozycji ukazało się po roku 2010. Bibliografia zawiera również jedną pracę Doktorantki.

Całość pracy, zawarta jest na 98 ponumerowanych stronach.

#### 2. Ocena doboru tematu rozprawy

Zjawisko chorób genetycznych jest istotnym problemem nękającym zarówno populacje naszego gatunku jak i zwierząt nam towarzyszących czy użytkowanych produkcyjnie. W myśl zasady, że lepiej zapobiegać niż leczyć, najlepszą i szeroko stosowaną strategią w próbach zmniejszenia problemu chorób genetycznych w populacjach zwierząt jest poznanie mechanizmów ich genetycznego uwarunkowania i



zastosowanie schematów kojarzeń zmniejszających frekwencje tych negatywnych zjawisk. W związku z tym każde badania prowadzone w tym zakresie są ważne i godne uwagi tym bardziej te prowadzone na zwierzętach mogących potencjalnie służyć jako model takich uwarunkowań dla człowieka. W większości choroby neurologiczne charakteryzują się, oprócz złożonego najczęściej wielogenowego podłoża czasami powiązanego dodatkowo z oddziaływaniem czynników środowiska, specyfiką rasową. I jak się okazuje dla każdej rasy czy grupy rasowej inne geny warunkują te zjawiska. Kolejną trudnością mogą być małe liczebności dostępnych, obciążonych chorobą osobników do badań i konieczność stosowania różnorodnych narzędzi zwiększających możliwości badawcze.

**W związku z tym, bardzo wysoko oceniam dobór tematu rozprawy doktorskiej, w której Doktorantka podjęła temat analizy polimorfizmów genów potencjalnie odpowiedzialnych za padaczkę idiopatyczną u psów.**

### 3. Ogólna charakterystyka rozprawy

Treść rozprawy doktorskiej została przedstawiona w siedmiu zasadniczych rozdziałach, które zostały poprzedzone spisem treści.

We wstępie - **rozdział pierwszy**, Autorka rozprawy, w sposób bardzo syntetyczny, przedstawiła tło i genezę poruszanych zagadnień uzasadniając zarówno znaczenie analizowanej rasy jak i badanej choroby neurologicznej.

W **rozdziale drugim** będącym przeglądem piśmiennictwa Doktorantka przedstawiła charakterystykę i historię rasy gończy polski. Część ta jest bardzo szczegółowa (mimo stosunkowo niewielkiej objętości – 29 stron) zarówno co do historii rasy jak i opisu pokroju i ich zmian od powstania do czasów współczesnych. Na uwagę zasługują podrozdziały poświęcone strukturze genetycznej analizowanej rasy. Autorka oprócz analizy rodowodowych linii matecznych i ojcowskich przedstawia informacje o zróżnicowaniu różnych markerów molekularnych w tej rasie łącznie z allelami prywatnymi. Podkreślić należy że w tej części pracy Doktorantka przedstawia również swoje własne badania tych zależności. Na stronie 23 pracy pojawia się informacja, że w związku z małą liczbą założycieli rasy (24 osobniki po połowie samce i samice) w populacji występuje wysokie spokrewnienie i niewielkie zróżnicowanie genetyczne. Tymczasem cytowane dalej badania zarówno innych autorów jak i przedstawione w wynikach badania własne Autorki wskazują na coś przeciwnego (co znalazło nawet potwierdzenie w drugim punkcie rozdziału wnioski). Jak wytłumaczyć tą różnicę. W dalszej części Doktorantka opisuje różne formy padaczki i sposoby ich diagnozy a także szczegółowo charakteryzuje geny zaangażowane w powstawanie tego schorzenia u różnych ras. Szczególnie skupiając się na analizowanych w dalszej części pracy następujących genach: ADAM23, DOK5, PCDH9, ARFGEF2. Całość oparta jest o aktualne piśmiennictwo ale należy zweryfikować zarówno zgodność podawanych w pracy pozycji ze spisem i odwrotnie (15 pozycji nie ma w spisie lub są w spisie ale nie ma do nich odwołania w tekście) i jest bardzo wiele literówek oraz wiele niezgadujących się ze sobą dat publikacji.

Kolejny w pracy **rozdział trzeci** – cel pracy w którym autorka przedstawiła dwa zasadnicze cele badań identyfikacje genów i zawężenie ich liczby do najbardziej prawdopodobnych w wywoływaniu analizowanego schorzenia. Zarówno cel główny jak i cel szczegółowy są właściwe i jasno sprecyzowane.



Materiał i metody czyli **rozdział czwarty** został zredagowany typowo dla pracy badawczej. W części pierwszej pokrótce scharakteryzowany został materiał badawczy było to łącznie 48 osobników rasy gończy polski w tym 12 osobników chorych. W tabeli 5 zamieszczono informacje o osobnikach chorych. Jest tam m.in. kolumna opisana jako lekooporność. Nie ma natomiast informacji (lub ja jej nie znalazłem) w jaki sposób tą właściwość definiowano (w formularzu ankiety będącej podstawą rozpoznania choroby nic takiego nie funkcjonuje). Podrozdział metody konsekwentnie został podzielony na metody: analizy rodowodowej (podano właściwe narzędzia do tego typu badań); genetycznej przeprowadzone przy użyciu mikromacierzy Illumina CanineHD BeadChip a genotypowanie wykonano w Laboratorium Genetyki Bydła w Parzniewie; statystycznej analiza asocjacyjna GWAS, analiza pojedynczych polimorfizmów oraz analiza w obrębie genu ADAM23. Ten ostatni podrozdział w rzeczywistości obejmuje metaanalizę w obrębie tego genu i może lepiej to doprecyzować. Wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu właściwych narzędzi bioinformatycznych i we właściwej sekwencji łącznie z analizą haplotypów o ile występowała taka możliwość. W analizie pojedynczych polimorfizmów zastosowano cztery modele genetyczne kodominacji, dominacji, recesywny overdominacji. Są to rozwiązania jak najbardziej właściwe i najczęściej standardowo wykorzystywane do tego typu badań. Czy Autorka rozważyła zastosowanie modelu addytywno logistycznego, który też może być uwzględniany przy tego typu badaniach?

W **rozdziale piątym** - wyniki (najbardziej obszernym w pracy - 32 strony) w poszczególnych podrozdziałach w sposób jasny i czytelny Autorka przedstawiła wyniki własnych badań ilustrując je dobrze opracowanymi tabelami, wykresami i schematami. Jest niewątpliwie bardzo dobrze przygotowana i zaprezentowana część pracy. Pierwszy podrozdział zawiera wyniki analiz rodowodowych, w kolejnym przedstawiono wyniki GWAS i dalej analizy pojedynczych polimorfizmów. W części poświęconej wynikom w obrębie genu ADAM23 (wyniki metaanalizy) pierwsze dwie strony (62-63) przedstawiają informacje które bardziej odpowiadają opisowi metod w części poświęconej właśnie metaanalizie. Uzyskane rezultaty Autorka przedstawiła w sposób logiczny, wyczerpujący i syntetyczny właściwie je interpretując.

**Rozdział szósty** to dyskusja uzyskanych rezultatów na tle badań innych autorów, i co bardzo cenne, Doktorantka poprawnie interpretując uzyskane rezultaty jednocześnie umiejętnie i logicznie wyjaśnia przyczyny różnic w badaniach własnych i wynikach innych autorów. W recenzowanych badaniach potwierdzone zostały sugestie wielu innych badaczy o bardzo złożonym charakterze tej choroby neurologicznej wskazując na jej specyficzny rasowo charakter. Dodatkowo wydaje się ona być uwarunkowana poligenicznie z sumującymi się efektami. W analizowanej rozprawie udało się zawęzić liczbę genów kandydujących, jako odpowiedzialne za to schorzenie, w rasie gończy polski. Były to następujące geny: DOK5; ADAM23, ARFGEF, PCHD9 z których tylko pierwszemu w piśmiennictwie przypisywano takie działanie. Autorka w badaniach zweryfikowała model najczęściej predysponujący do tej choroby w układzie genu DOK5 jako heterozygotyczny. Bardzo cennym rezultatem jest powiązanie z padaczką idiopatyczną pozostałych genów (ADAM23 i PCHD9). Wyniki istotne uzyskano nie tylko w analizie poszczególnych genów ale również w układach poligenowych. Autorce udało się wykluczyć z grupy genów kandydujących u rasy gończy polski gen ARFGEF, który zarówno w układzie monogenowym jak i poligenowym analizy nie wykazywał związku z padaczką idiopatyczną u tej rasy. Niewątpliwie dużą wartością rozprawy jest zastosowanie metaanalizy w odniesieniu do genu ADAM23 zarówno jako samego narzędzia w sytuacji gdy obserwowanych przypadków fenotypowych jest stosunkowo niewiele a także



dlatego że udało się wykazać oddziaływanie tego genu w układach poligenowych na częstość występowania padaczki idiopatycznej.

Wnioski - **rozdział siódmy**, w których Autorka przedstawiła efekty przeprowadzonych badań w postaci siedmiu punktów. Wprawdzie rozdział nosi tytuł wnioski ale faktycznie jest raczej połączeniem podsumowania (pkt 1, 2 i 3) i wniosków (punkty 5, 6 i 7) oraz stwierdzeń, które nie są ani podsumowaniem ani wnioskiem (punkt 4) bo ta obserwacja była podstawa przeprowadzenia badań (jak wynika ze wstępu).

#### 4. Ocena merytoryczna rozprawy

Celem rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Garbacz była analiza polimorfizmu w genach potencjalnie odpowiedzialnych za padaczkę idiopatyczną u psów rasy gończy polski.

Cel pracy przyjęty przez Doktorantkę został prawidłowo i właściwie sformułowany. Metodyka postępowania opisana w pracy może znaleźć zastosowanie praktyczne w identyfikowaniu osobników będących nosicielami padaczki idiopatycznej nie tylko w analizowanej rasie gończy polski ale również jest elementem szerszych badań umożliwiających poznanie podłoża genetycznego tego schorzenia u różnych ras psów. 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. „Analiza polimorfizmu w genach potencjalnie odpowiedzialnych za padaczkę idiopatyczną w populacji gończego polskiego” jest ciekawa zarówno pod względem naukowym jak i praktycznym. Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy aktualnych problemów związanych z badaniem podłoża genetycznego padaczki u psów połączonych z wszechstronną analizą właściwości genetycznych tej rasy. Niewątpliwą wartością ocenianej rozprawy jest wykazanie specyficzności rasowej w podatności na padaczkę rasy gończy polski co wpisuje się w ogólnie występującą specyfikę rasową tych uwarunkowań stwierdzoną u psów. Wysoko należy również ocenić wstępne zdiagnozowanie zależności poligenicznych tego schorzenia u badanej rasy co także wydaje się być częste u gatunku pies domowy. Na podstawie przeprowadzonej analizy treści pracy uważam, że Doktorantka dokonała trafnego wyboru tematyki swoich badań, a praca stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego. Tak przedstawiona dysertacja nawiązuje do aktualnej wiedzy i praktyki, wnosząc do niej nowe treści. Cel rozprawy został sformułowany poprawnie, osiągnięty i potwierdzony wynikami. Przedstawiona przez Doktorantkę metoda 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 zootechnika i rybactwo. Zgromadzony w ramach realizacji pracy obszerny materiał badawczy może zostać wykorzystany do dalszej analizy naukowej. Autorka pracy – mgr inż. Aleksandra Garbacz 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, ale które w moim przekonaniu nie obniżają 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 inż. Aleksandry Garbacz pt.: „Analiza polimorfizmu w genach potencjalnie odpowiedzialnych za padaczkę idiopatyczną w populacji gończego polskiego”, spełnia warunki określone w *art. 187 ust. 1-3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zmianami)* stawiane rozprawom doktorskim oraz mieści się w dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie jej do publicznej obrony.

*Krzysztof Dąb*