

Prof. dr hab. Agnieszka Noszczyk-Nowak

Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

agnieszka.noszczyk-nowak@upwr.edu.pl

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Pawła Wojtaszczyka

„Badania nad określeniem poziomu zróżnicowania ekspresji genu *Foxp3* u lisa pospolitego *Vulpes vulpes* oraz ocena zróżnicowania poziomu jego ekspresji w porównaniu do psa domowego *Canis familiaris* w świetle funkcji czynników transkrypcyjnych forkhead box”.

Z

Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Wprowadzenie

W literaturze naukowej ilość informacji dotyczącej lisa pospolitego *Vulpes vulpes* jest wciąż niewielka, w porównaniu do innych gatunków zwierząt, stąd temat podjęty przez doktoranta mgr inż. Pawła Wojtaszczyka uważam za bardzo aktualny i wypełniający lukę dotyczące tego gatunku. Podobnie ilość informacji w literaturze naukowej dotyczącej ekspresji genów *Foxp3* u zwierząt też jest niewielka. Wyszukując „*Foxp3* expresion in dogs” znaleziono jedynie 69 publikacji w bazie PubMed, a wyszukując „*Foxp3* expresion in fox” nie znaleziono żadnej publikacji.

Rozprawa doktorska mgr inż. Pawła Wojtaszczyka „Badania nad określeniem poziomu zróżnicowania ekspresji genu *Foxp3* u lisa pospolitego *Vulpes vulpes* oraz ocena zróżnicowania poziomu jego ekspresji w porównaniu do psa domowego *Canis familiaris* w świetle funkcji czynników transkrypcyjnych forkhead box” poświęcona jest badaniom ekspresji genu *Foxp3* oraz HPRT.

Omówienie pracy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 118 stron wydruku komputerowego, zawiera 8 tabel i 87 rycin oraz odnosi się do 109 pozycji piśmiennictwa, ma typowy układ dla tego typu prac i została zaopatrzona w streszczenie w języku polskim i angielskim. Niestety zabrakło wykazu skrótów, wskazanego w tego typu opracowaniach.

W streszczeniu, zarówno polskim, jak i angielskim, oraz w całej treści pracy doktorant używa różnej pisowni dla „*Foxp3*” (*Foxp3*, *FOXP3*, *foxp3*) oraz forkhead (pisane razem jak w tytule, jako 2 słowa np. str. 10 lub z myślnikiem str. 33). Konieczne jest ujednoczenie zapisu w całej pracy.

W obszernym, 18-stronicowym wstępie, zawierającym 13 rycin, Doktorant omawia szczegółowo geny *Foxp3* i HPRT oraz ich rolę u różnych gatunków w oparciu o aktualną literaturę. Praca doktorska jest w całości napisana w języku polskim, jednak ryciny

konsekwentnie są prezentowane w języku angielskim. Nawet jeśli Doktorant korzystał z rycin źródłowych (podano bibliografię) to należałoby przygotować te ryciny w języku polskim.

Cele pracy

Doktorant podjął się oceny zróżnicowania poziomu ekspresji genu Foxp3 u lisa pospolitego w porównaniu do psa domowego w kontekście markerów genetycznych determinujących wskaźniki odporności. Cel pracy zostały sprecyzowany jasno, a biorąc pod uwagę ilość informacji dotyczącej ekspresji w/w genów u zwierząt, wyznaczone przez Doktoranta cele są bardzo ważne i przydatne z punktu widzenia dyscypliny weterynaria.

Materiał i Metody

W kolejnym rozdziale Doktorant omawia materiał oraz metody zastosowane w pracy badawczej. Brakuje informacji na jakiej podstawie została określona liczebność grup zwierząt włączonych do badań. W akapicie pierwszym Doktorant opisuje w jakich okolicznościach materiał do badań był pobierany. W świetle Ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych na prezentowane badania nie jest wymagana zgoda Komisji Etycznej, a jedynie zgoda właścicieli na wykonanie niezbędnych badań diagnostycznych, jednak taka informacja winna się znaleźć w niniejszym rozdziale. Pewną konsternację czytającego budzą kryteria włączenia zwierząt do badania w świetle później prezentowanych wyników. Doktorant pisze, że kryterium włączenia był m.in. wiek nie młodszy niż 1 rok. W tabeli 2 pies P29 ma wiek poniżej 1 roku, ponadto w prezentowanych wynikach przewija się podział na grupy do roku i powyżej roku. Proszę o wyjaśnienie tych rozbieżności. Tabela 2 zawiera także błędy dotyczące pisowni ras w przypadku psa P2 i P31.

W kolejnych podrozdziałach Doktorant szczegółowo opisuje kolejne etapy prac laboratoryjnych, pozwalające na dokładne zrozumienie kolejnych etapów prac. Na str. 35 jako

ilustracja prezentowanych metod pojawia się elektroforegram dla genów Foxp3 i HPRT wykonany u norki i jenota (ryc. 14 i 15). Gatunki te nie były wymienione w materiałach. Ponadto nie ma oznaczeń na rycinie, który elektroforegram dotyczy którego gatunku, w tym lisa.

Analiza statystyczna

W tym rozdziale Doktorant opisuje użyte metody statystyczne, jednak nie podano jakim testami statystycznymi posługiwano się w przypadku tej analizy, nie podano też czy uzyskane wyniki miały rozkład normalny. Brak też informacji czy grupy badane różniły się od siebie istotnie pod względem płci.

Wyniki

W obszernym rozdziale Doktorant prezentuje wyniki swojej pracy w postaci opisu, rycin i tabel. Wskazane byłoby podzielenie tego rozdziału na podrozdziały.

W pierwszym zdaniu Doktorant pisze, że wartość wyników Ct uzyskiwały powtarzalność z nielicznymi włączeniami, niestety nie wiadomo z jakimi i co było podstawą tego wyłączenia. Pytanie też czy Doktorant miał na myśli $p < 0,05$ czy $p \leq 0,05$ – proszę o wyjaśnienie, ponieważ zazwyczaj wartość p przyjmuje się $p \leq 0,05$.

Doktorant omawia pewne wyniki w oparciu o płć badanych zwierząt i wyciąga wnioski. Nasuwa się jednak wątpliwość dotycząca siły tego wnioskowana, ponieważ na ryc. 25 widać różnicę w ilości samic i samców lisa pospolitego. Proszę o wyjaśnienie tej kwestii i jej wpływu na uzyskane wyniki. Na stronie 55 Doktorant pisze, o wyraźnie niższym poziomie ekspresji genu, co nie znalazło potwierdzenia w wartości p , co jednoznacznie oznacza, że różnica nie jest wyraźna. Podobne stwierdzenia możemy znaleźć na w całym rozdziale Wyniki.

Od strony 65 prezentowane są wyniki dotyczące ekspresji genów w zwierząt poniżej 1 roku i powyżej 1 roku. Proszę o wyjaśnienie, jak ma się to do kryteriów włączenia opisanych na stronie 28 oraz tabeli 1 (brak zwierząt w wieku poniżej 1 roku) i 2 (jedno zwierzę poniżej roku).

Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku wyników dotyczących psa rasy bokser (wg tab. 1 – 1 pies tej rasy). Doktorant na str. 77 używa liczby mnogiej i prezentuje na str. 74 pojedynczy wynik jako istotny, choć jest on jednostkowy. Rycina 60 jest nieczytelna. Na stronie 86 brakuje wartości p dla stwierdzenia „ewidentnie” niższej ekspresji genu *Foxp3* u lisa pospolitego, w porównaniu do psa.

Dyskusja

W obszernej 15-stronicowej dyskusji Doktorant omawia wyniki swoich badań w świetle prac innych autorów. Szczególnie ważnym elementem dyskusji jest fragment dotyczący braku zasadności stosowania starterów projektowanych do amplifikacji materiału genetycznego pochodzącego od psa, do powielania liczby kopii tych samych regionów genetycznych u lisa pospolitego. Przekonujące rozumowanie, trafne obserwacje jak i konsekwentny logiczny ciąg wyводу potwierdzają rzetelność warsztatu badacza. W dyskusji należałoby przenieść ciężar na te wyniki, które uzyskały istotność statystyczną i wystrzegać się formułowania stanowczych wniosków, jeśli uzyskane wyniki dotyczą grup o małej liczebności, choć niektóre z obserwacji mogą się potwierdzić i być prawdziwe dla grup o większej liczebności i znormalizowanym rozkładzie danej cechy jak wiek czy rasa. W przypadku wyniku uzyskanego dla psa rasy bokser należy wykazać się szczególną ostrożnością, zwłaszcza w aspekcie przyszłego ewentualnego wiązania pojedynczego wyniku dotyczącego ekspresji *Foxp3* ze skłonnością tej rasy do arytmogenicznej kardiomiopatii prawej komory. W tym fragmencie dyskusji należało zacytować badania Kathryn M. Meurs, która jest niekwestionowanym ekspertem w tym obszarze. Szczególnie interesującym aspektem dla przyszłych badań pozostaje analiza potencjalnych obszarów modyfikacji odpowiedzi immunologicznej, opartej o czynnik transkrypcyjny *Foxp3* w warunkach starzenia się. Umożliwiają to m.in. przeprowadzone przez Doktoranta badania, jednak zanim to nastąpi, należy poszerzyć badane grupy, tak aby przedstawiciele danego gatunku w każdym wieku byli reprezentowani w większej ilości niż jako pojedyncze osobniki.

Analiza ograniczeń metodologicznych i technicznych pracy jako osobny podrozdział stanowiłaby cenne uzupełnienie dysertacji.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań Autor wyciągnął 8 wniosków. Niektóre z nich wymagają jednak przeredagowania, jak wniosek nr 3, który wydaje się być zbyt radykalny oraz wniosek nr 8, który nie znajduje podstaw w przedstawionych wynikach. Wniosek nr 4 jest zgrabnym podsumowaniem wyników i winien znaleźć się w rozdziale 6.

Piśmiennictwo

Piśmiennictwo pracy ma typowy układ, jest współczesne, prawidłowo dobrane i odpowiednio liczne, w przeważającym stopniu anglojęzyczne, jednak jego zapis graficzny wymaga ujednolicenia.

Jak każda praca, również przedstawiona do recenzji dysertacja nie ustrzegła się przed pojedynczymi pomyłkami oraz drobnostkami literowymi czy interpunkcyjnymi, nie wpływającymi na jej wartość naukową.

Podsumowanie

W podsumowaniu opinii dobrze oceniam przygotowanie teoretyczne Doktoranta, umiejętność postawienia problemu badawczego i jego rozwiązania. Sposób przeprowadzenia badań, dobre przygotowanie metodyczne, sposób przedstawienia wyników i ich interpretacja dowodzi dobrej znajomości przedmiotu badań. Przedstawiona dysertacja poszerza wiedzę na temat zróżnicowanej ekspresji ocenianych genów u lisa pospolitego oraz psa i może stać się przyczynkiem dla innych badaczy do rozwijania tego obszaru badań w różnych aspektach.

Rozprawa doktorska mgr inż. Pawła Wojtaszczyka „Badania nad określeniem poziomu zróżnicowania ekspresji genu *Foxp3* u lisa pospolitego *Vulpes vulpes* oraz ocena zróżnicowania poziomu jego ekspresji w porównaniu do psa domowego *Canis familiaris* w świetle funkcji czynników transkrypcyjnych forkhead box” spełnia w mojej ocenie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria określone w art. 13 ustawy o

stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 64, poz. 595, ze zm.) w zw. z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (DZ.U. z 30.09.2018 r. poz. 1669).

Na tej podstawie przedstawiam Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław. 25.08.2022



Prof. dr hab. Agnieszka Noszczyk-Nowak