Olsztyn, 25.06.2023

dr hab. Katarzyna Żarczyńska, prof. UWM
Katedra Chorób Wewnętrznych z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UWM w Olsztynie

Opinia o pracy doktorskiej lek. wet. Dominiki Grzybowskiej pt. „Wpływ podwyższonego stężenia β-hydroksymaślanu w surowicy krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej na poziom ekspresji wybranych genów w wątrobie”

Pracę doktorską lek. wet. Dominiki Grzybowskiej stanowi opracowanie monograficzne przedstawione w formie manuskryptu liczącego 96 stron. Lek. wet. Dominika Grzybowska opracowała koncepcję badań, przeprowadziła analizę i interpretację wyników oraz wyciągnęła wynikające z nich wnioski.

Celem głównym pracy było określenie zmian wybranych wskaźników hematologicznych i biochemicznych krwi krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej oraz ocena zmian poziomu ekspresji wybranych genów w wątrobie w przebiegu podwyższonego surowiczego stężenia β-hydroksymaślanu (BHB).

Badania zostały przeprowadzone na 23 krowach będących po drugiej laktacji, które charakteryzowały się w poprzednich laktacjach wysoką wydajnością mleczną (średnio 9500 kg mleka). Krowy zakwalifikowane do doświadczenia podzielono na dwie grupy. Zwierzęta zdrowe, które w okresie od tygodnia przed do trzech tygodni po porodzie nie wykazywały podwyższonego stężenia β-hydroksymaślanu w surowicy stanowiły grupę kontrolną (n=11) Zwierzęta, u których co najmniej raz w badanym przedziale czasowym stężenie BHB znajdowało się w przedziale od 0,9 do 1,4 mmol/l, a średnie stężenie tego związku w trzech tygodniach po porodzie wynosiło ponad 0,8 mmol/l zostały włączone do grupy badawczej (n=12).

Materiał do badań stanowiły: krew pełna, surowica, wycinki wątroby, obrazy ultrasonograficzne wątroby i podskórnej tkanki tłuszczowej okolicy zadu. W pobranej krwi wykonano badania morfologiczne, natomiast w uzyskanej surowicy oznaczono wybrane parametry biochemiczne takie jak: stężenie glukozy, trójglicerydów, wapnia, cholesterolu, niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych i β-hydroksymaślanu oraz aktywność aminotransferazy asparaginianowej, aminotransferazy alaninowej, kinazy kreatynowej, dehydrogenazy mleczanowej i fosfatazy alkalicznej. W pełnej krwi oznaczono aktywność

peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej, natomiast w bioptatach tkanki wątrobowej określono poziom ekspresji genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową (SOD1, SOD2, SOD3) oraz peroksydazę glutationową (GPX3).

Na podstawie analizy uzyskanych wyników badań lek. wet. Dominika Grzybowska nie stwierdziła statystycznie istotnych różnic we wskaźnikach układu czerwonokrwinkowego, białokrwinkowego oraz parametrach płytkowych pomiędzy grupami zwierząt tydzień przed porodem oraz w 4. i 7. tygodniu po porodzie. Zaobserwowała natomiast zmiany podczas analizy parametrów biochemicznych. Zwierzęta grupy doświadczalnej w porównaniu do zwierząt z grupy kontrolnej wykazywały istotnie wyższe stężenie β-hydroksymaślanu przez 3 tygodnie po porodzie. Aktywność aminotransferazy alaninowej spadała po porodzie u krów z grupy badawczej, natomiast rosła u grupie kontrolnej zwierząt. Zaobserwowane zmiany wskazują, że aktywność aminotransferazy alaninowej może być wskaźnikiem różnicującym krowy niewykazujące wzrostu stężenia BHB tradycyjnie uznawanego za towarzyszące podklinicznej ketozie, a narażone na negatywne skutki hiperketonemii. Analizując aktywność aminotransferazy alaninowej Doktorantka wykazała wzrost aktywności tego parametru u krów z grupy doświadczalnej od tygodnia przed porodem do 2 tygodni po porodzie, co potwierdza wartość diagnostyczną tego wskaźnika przed i tuż po wycieleniu, nawet, gdy stężenie BHB nie osiąga wartości zwyczajowo uznawanych za towarzyszące podklinicznej ketozie.

W trakcie trwania całego doświadczenia Doktorantka nie wykazała statystycznie istotnych różnic w grubości podskórnej tkanki tłuszczowej pomiędzy grupami, natomiast zaobserwowała, że parametr ten ulegał istotnym zmianom w czasie. Uzyskane wyniki dowodzą, że krowy z utrzymującym się wyższym stężeniem BHB po porodzie (powyżej 0,8 mmol/l) wykazują podobny poziom mobilizacji rezerw tłuszczowych do krów niewykazujących takich zmian.

Analizując ultrasonogramy wątroby krów grupy doświadczalnej w 4. tygodniu po porodzie lek. wet. Dominika Grzybowska stwierdziła cechy charakterystyczne dla średniego i ciężkiego stopnia stłuszczenia wątroby, Zmian takich nie zaobserwowała u zwierząt grupy kontrolnej. Odsetek krów z prawidłowym obrazem ultrasonograficznym wątroby był wyższy w grupie kontrolnej w 4. i 7. tygodniu po porodzie, aczkolwiek wartości te były zbliżone.

Ekspresja SOD2 w wątrobie różniła się istotnie pomiędzy grupami w 4. tygodniu po porodzie i była istotnie skorelowana z ekspresją SOD3. Doktorantka nie zaobserwowała natomiast istotnych różnic w poziomach ekspresji SOD1, SOD3 i GPX3 zarówno pomiędzy grupami, jak i pomiędzy 4. a 7. tygodniem po porodzie. Sugeruje to możliwość wykorzystania oceny poziomu transkrypcji genów, w szczególności SOD2, jako biomarkera stopnia ketozy.

Analiza ekspresji genów może być również pomocna do określenia potencjału regeneracyjnego wątroby u krów po wystąpieniu ketozy, w szczególności w odniesieniu do stanów zaburzenia metabolizmu, którego wynikiem może być stres oksydacyjny.

Wyniki uzyskane przez lek. wet. Dominikę Grzybowską stanowią cenne źródło nowych informacji dotyczących jednej z najczęściej występującej jednostki chorobowej u krów wysokowydajnych, którą jest ketoza. Pozwalają one ponadto na poznanie bardziej szczegółowych, molekularnych mechanizmów, które towarzyszą hiperketonemii u bydła mlecznego.

W mojej opinii praca doktorska lek. wet. Dominiki Grzybowskiej została odpowiednio przygotowana, ma charakter nowatorski, opiera się na prawidłowo zaplanowanym i przeprowadzonym doświadczeniu, a uzyskane wyniki w sposób istotny poszerzają wiedzę z zakresu chorób metabolicznych bydła.

dr hab. Katarzyna Żarczyńska, prof. UWM