Olsztyn, 26.06.2023

Prof. dr hab. Przemysław Sobiech
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. Lek. wet. Dominika Grzybowska opracowała koncepcję badań, przeprowadziła analizę i interpretację wyników oraz wyciągnęła wynikające z nich wnioski.

Głównym celem badań doktorantki była ocena zmian wybranych wskaźników hematologicznych i biochemicznych krwi krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej oraz określenie zmian poziomu ekspresji wybranych genów w wątrobie w przebiegu podwyższonego surowiczego stężenia β-hydroksymaślanu (BHB).

Materiał badawczy stanowiły 23 krowy będące po drugiej laktacji, charakteryzujące się wysoką wydajnością mleczną w poprzednich laktacjach (średnio 9500 kg mleka). Wyselekcjonowane krowy podzielono na dwie grupy: kontrolną (n=11) - zwierzęta zdrowe, które w okresie od tygodnia przed do trzech tygodni po porodzie nie wykazywały podwyższonego stężenia β-hydroksymaślanu w surowicy oraz badawczą (n=12) - zwierzęta, u których co najmniej raz w tym 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.

Począwszy od 1. tygodnia przed porodem do 9. tygodnia po porodzie zbierano materiał badawczy, który stanowiły: krew (co tydzień), ultrasonograficzny obraz wątroby (4. tydzień po porodzie, 7. tydzień po porodzie) i podskórnej tkanki tłuszczowej okolicy zadu (co tydzień) oraz wycinki wątroby uzyskane w wyniku biopsji gruboigłowej pod kontrolą USG (4. tydzień po porodzie, 7. tydzień po porodzie). 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. W zakresie badań enzymatycznych oznaczono surowiczą

aktywność aminotransferazy asparaginianowej, aminotransferazy alaninowej, kinazy kreatynowej, dehydrogenazy mleczanowej oraz fosfatazy alkalicznej. Dodatkowo w pełnej krwi oznaczono aktywność peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej. W bioptatach uzyskanych z tkanki wątrobowej określono poziom ekspresji genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową i peroksydazę glutationową (SOD 1, SOD 2, SOD 3, GPX3).

W ramach przeprowadzonych badań lek. wet. Dominika Grzybowska nie stwierdziła statystycznie istotnych różnic w badaniu morfologicznym krwi pomiędzy grupami zwierząt tydzień przed porodem oraz w 4. i 7. tygodniu po porodzie. Stwierdzono natomiast szereg zmian we wskaźnikach biochemicznych. U zwierząt z grupy doświadczalnej wysokie stężenie BHB utrzymywało się przez 3 tygodnie p.p. na istotnie wyższym poziomie niż w grupie kontrolnej. Aktywność ALT po porodzie spadała u zwierząt z grupy badawczej, natomiast rosła w grupie kontrolnej. Zaobserwowane zmiany dowodzą, że aktywność ALT może być przydatnym wskaźnikiem różnicującym krowy niewykazujące podwyższenia stężenia BHB tradycyjnie uznawanego za towarzyszące podklinicznej ketozie, a narażone na negatywne skutki hiperketonemii. Średnia aktywność AST wykazywała zmiany pod wpływem czasu, które były istotnie różne w obu grupach. Odmienne zachowanie się tego parametru w grupie kontrolnej i badawczej po porodzie dowodzi, że określanie aktywności AST może być wskaźnikiem przydatnym w diagnostyce krów z podklinicznymi stanami hiperektonemii.

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w grubości podskórnej tkanki tłuszczowej pomiędzy grupami przez cały czas trwania eksperymentu, natomiast parametr ten wykazywał istotne zmiany 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.

W badaniu ultrasonograficznym wątroby w 4. tygodniu po porodzie nie stwierdzono cech 2. i 3. stopnia stłuszczenia tego narządu w przeciwieństwie do grupy badawczej. 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. Poziomy ekspresji SOD 1, SOD 3 i GPX3 nie różniły się istotnie ani pomiędzy grupami ani pomiędzy 4. a 7. tygodniem po porodzie. Wskazuje to na 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.

Uzyskane przez lek. wet. Dominikę Grzybowską wyniki dostarczają nowych informacji na temat chorób metabolicznych u bydła mlecznego, przyczyniając się do rozwoju wiedzy na temat molekularnych mechanizmów towarzyszących hiperketonemii.

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 istotnie rozszerzają wiedzę z zakresu chorób metabolicznych bydła.

Prof. dr hab. Przemysław Sobiech

Przemysław Sobiech