Prof. dr hab. Jan Twardoń

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich

Wrocław, 21 sierpnia 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Dominiki Grzybowskiej pt.: Wpływ podwyższonego poziomu β-hydroksymaślanu w surowicy krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej na poziom ekspresji wybranych genów w wątrobie". Opinię wykonano zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 7 lipca 2023 r. Praca doktorska wykonana została w Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Przemysław Sobiech a promotorem pomocniczym dr hab. Katarzyna Żarczyńska, prof. UWM. Badania sfinansowano ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu nr 2018/29/N/NZ5/00520,, pt. „ Analiza transkryptomu wątroby u krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej przy użyciu techniki AMPLI-seq".

Największy postęp w polskim rolnictwie w ostatnich latach dokonano w zakresie hodowli bydła mlecznego, związanej z tym produkcji mleka i jego przetwórstwa. Dokonano tego poprzez zwiększenie populacji bydła o genetyce gwarantującej wysoką wydajność mleczną (rasa Holsztyńsko-Fryzyjska), znaczną poprawę dobrostanu w tym warunków utrzymania, żywienia i zarządzania tymi procesami. Wszystkie okresy życia i produkcji u zwierząt gospodarskich są bardzo ważne. Ale biorąc pod uwagę ich stan zdrowotny i jego wpływ na produkcję mleka, to tak zwany okres przejściowy trwający od początku zasuszenia (niektórzy autorzy podają od 3 tygodnia przed porodem) do 3 tygodnia po porodzie jest najważniejszy. Błędy organizacyjne, głównie żywieniowe popełnione w okresie zasuszenia ujawniają się w okresie porodu i poporodowym, w postaci ciężkiego porodu oraz chorób metabolicznych. Skutkuje to spadkiem jakości i ilości produkowanego mleka oraz zaburzeniami płodności. Schorzenia metaboliczne okresu poporodowego to następstwo nie właściwego żywienia w okresie zasuszenia i nie dostosowania jego wartości do

wydajności mlecznej w okresie poporodowym. W następstwie nie dostosowania dawki pokarmowej do określonej wydajności mlecznej oraz zmniejszenie jej pobierania w omawianym okresie dochodzi do ujawnienia się ujemnego bilansu energetycznego co prowadzi do powstania takich zaburzeń jak: ketoza, syndrom stłuszczenia wątroby, schorzenia spowodowane niedoborem makro i mikroelementów. Zjawiska te szczególnie uwidaczniają się w fermach o wysokiej wydajności mlecznej oraz złym zarządzaniu tymi gospodarstwami. Biorąc pod uwagę wymienione czynniki, stwierdzam, że doktorantka dokonała słusznego wyboru obszaru badań i tematu pracy doktorskiej. To ciągle aktualny obszar badań, zmieniający się wraz ze wzrastającymi wydajnościami mlecznymi oraz dążeniem do uzyskiwania rekordowych wydajności.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 95 stron maszynopisu z następującymi rozdziałami: wykaz skrótów, wykaz tabel, wykaz rycin, streszczenie, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, omówienie wyników, wnioski, piśmiennictwo. Wyniki badań zestawiono w bogatej dokumentacji na którą składa się 15 tabel oraz 22 ryciny. Uzyskane wyniki poddano analizie, stosując różne metody statystyczne, opisane w rozdziale 8.8 „ Analiza statystyczna". Piśmiennictwo obejmuje 108 dobrze dobranych pozycji.

Celem pracy 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 BHB. Wymieniony cel realizowano poprzez następujące zadaniach szczegółowe: - ocenę ogólnego stanu klinicznego zwierząt na podstawie zmian wskaźników morfologicznych i biochemicznych krwi, - ocenę obecności cech tłuszczowego nacieczenia hepatocytów w badaniu ultrasonograficznym wątroby, - izolację RNA w celu określenia poziomu ekspresji genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową i peroksydazę glutationową, - określenie wpływu podwyższonego stężenia β-hydroksymaślanu w surowicy krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej na poziom ekspresji genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową i peroksydazę glutationową w wątrobie.

Badania zostały przeprowadzone w stadzie bydła mlecznego rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej liczącego 189 krów mlecznych, utrzymywanych w oborze wolnostanowiskowej z zachowaniem wymogów dobrostanu. Dój odbywał się dwa razy dziennie w hali udojowej z zachowaniem właściwych środków higieny doju. Sześcio miesięcznemu monitoringowi poddano wszystkie krowy w stadzie będące co najmniej 3 tygodnie przed porodem. Z doświadczenia zostały

wykluczone krowy u których stwierdzono schorzenia wymagające leczenia farmakologicznego lub chirurgicznego w przedziale czasowym: od tygodnia przed porodem do 3 tygodni po porodzie. Wykluczono również wszystkie pierwiastki i jałówki. Do właściwego doświadczenia po przeprowadzeniu monitoringu zakwalifikowano 23 krowy będące po drugiej laktacji, o wysokiej wydajności mlecznej w poprzednich laktacjach (średnio 9500 kg mleka). Zwierzęta podzielono na grupę kontrolną – CONT (n=11 szt.) oraz doświadczalną -EXP (n=12 szt). W grupie kontrolnej zwierzęta nie wykazywały podwyższonego stężenia BHB w surowicy natomiast w grupie doświadczalnej co najmniej raz w określonym 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 0,8 mmol/l. Materiał badawczy w obu grupach stanowiły: krew pełna, surowica, wycinki wątroby, obrazy ultrasonograficzne wątroby i podskórnej tkanki tłuszczowej okolicy zadu . Do wykonania zadań szczegółowych przeprowadzono: badania biochemiczne i morfologiczne krwi, ocenę kondycji krów, ultrasonograficzną ocenę obrazów wątroby, gruboigłową biopsję wątroby pod kontrolą USG, izolację RNA, reakcję qRT-PCR, analizę statystyczną.

Doświadczenia zostały przeprowadzone na zwierzętach właściwie dobranych pod względem rasy, wydajności mlecznej i okresu reprodukcji. Harmonogram wykonanych doświadczeń w aspekcie doboru materiału, i jego oceny był właściwy w odniesieniu do założonego celu pracy. Zastosowane metody badań klinicznych i laboratoryjnych są adekwatne do stosowanych i opisywanych w literaturze krajowej i zagranicznej.

Na podstawie przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników, doktorantka sformułowała 7 wniosków w których odnosi się do założonego celu i zadań szczegółowych pracy. Ocena otrzymanych wyników badań jest następująca: - wysokie stężenie BHB nie wpływa na wyniki badania morfologicznego krwi, - aktywność ALT jest przydatnym wskaźnikiem różnicującym krowy narażone na negatywne skutki hiperketonomii, - utrzymujące się wyższe stężenie BHB u krów po porodzie powoduje podwyższenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, natomiast nie wpływa istotnie na aktywność peroksydazy glutationowej, - krowy z utrzymującym się wyższym stężeniem BHB po porodzie (powyżej 0,8 mmol/l) wykazują podobny poziom mobilizacji rezerw tłuszczowych do krów nie wykazujących takich zmian, - obecność cech tłuszczowego nacieczenia hepatocytów nie wpływa na jakość RNA izolowanego z wycinków wątroby, - wyniki analiz molekularnych wskazują na możliwość wykorzystania oceny poziomu transkrypcji genów, w szczególności

SOD2 jako wskaźnika biomarkera stopnia ketozy, - analiza ekspresji genów może być pomocna do określenia potencjału regeneracyjnego wątroby u krów po wystąpieniu ketozy, w szczególności w odniesieniu do zaburzonego metabolizmu powodującego stres oksydacyjny.

Przeprowadzone przez doktorantkę badania i otrzymane wyniki są ważne, ponieważ dotyczą wciąż aktualnego problemu zaburzeń przemiany materii a w tym głównie hiperketonemii i jej skutków u krów wysokowydajnych w okresie okołoporodowym. Pomimo bardzo dużej ilości badań w tym obszarze w ostatnich kilkudziesięciu latach, problem hiperketonemii jest nadal tematem zainteresowań wielu ośrodków naukowych na całym świecie. Zasadne staje się więc poszukiwanie nowych czynników i mechanizmów powstawania hiperketonemii na poziomie molekularnym uwzględniającym szlaki metaboliczne, geny kodujące, sieci regulacyjne genów i poziom ekspresji wybranych genów w poszczególnych narządach. Badania takie będą pomocne w odnalezieniu markerów genetycznych i biochemicznych pozwalających na wczesną, przed porodową identyfikację krów zagrożonych hiperketonemią. Pozwoli to na szybkie podjęcie działań zapobiegających eliminację tych zwierząt ze stada i polepszenia wskaźników ekonomicznych w danym gospodarstwie.

Rozprawa doktorska napisana jest w sposób zwarty i uporządkowany. Jej treść świadczy o tym, że doktorantka dysponuje odpowiednim zasobem wiedzy i ma opanowany warsztat badawczy w omawianej tematyce.

Mimo pozytywnej oceny pracy, z obowiązku recenzenta pragnę wskazać na następujące usterki:

- badania zostały przeprowadzone na zbyt małej populacji zwierząt,
- doświadczenie przeprowadzono tylko w jednym gospodarstwie o jednolitych warunkach dobrostanu,
- biopsja wątroby została dokonana na bardzo ograniczonym jej wycinku,
- próbki do badań morfologicznych krwi oraz biopsja wątroby przeprowadzane były w zbyt dużych odstępach czasowych

Nieliczne uwagi dotyczące przedmiotowej dysertacji nie obniżają jej wartości merytorycznej. Podsumowując stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska przedstawia duże wartości aplikacyjne a otrzymane wyniki rozszerzają wiedzę naukową w tej dyscyplinie badań.

W mojej ocenie rozprawa doktorska lekarza weterynarii Dominiki Grzybowskiej pt." Wpływ podwyższonego stężenia β-hydroksymaślanu w surowicy krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej na poziom ekspresji wybranych genów w wątrobie„ stanowi interesujące samodzielne rozwiązanie problemu naukowego w odniesieniu do założeń badawczych, opracowania wyników, metodyki i wniosków a prezentacja redakcyjna wyników przeprowadzonych badań jest również dowodem umiejętności autorki do prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa spełnia ustawowe kryterium dotyczące oryginalnego rozwiązania w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej.

Uważam, że rozprawa doktorska odpowiada przepisom ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669 ze zm.).

Przedkładam zatem wniosek Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie pracy i dopuszczenie lekarza weterynarii Dominki Grzybowskiej do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Prof. dr hab. JAN TWARDOŃ
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
50-366 Wrocław, pl. Grunwaldzki 49