Puławy, 2023.08.25

prof. dr hab. Dariusz Bednarek
Zakład Chorób Bydła i Owiec
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

**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"***

przygotowanej w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
pod kierunkiem promotora: **prof. dr. hab. Przemysława Sobiecha**
oraz promotora pomocniczego: **dr. hab. Katarzyny Żarczyńskiej, prof. UWM**

Recenzję opracowano w oparciu o uchwałę Nr 27/2023 Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 7 lipca 2023 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria lek. wet. Dominice Grzybowskiej.

Oceniana praca doktorska w ogólnym zarysie obejmuje bardzo ważny i często niedoceniany problem hiperketonemii wysoko wydajnych krów mlecznych spotykanej najczęściej w tzw. okresie przejściowym (ang. *transition period*), tj. od 3. tyg. przed do 3-4. tyg. po porodzie, a związanej z ujemnym bilansem energii – NEB (ang. *negative energy balance*) i uruchamianiem rezerw tłuszczowych na jego pokrycie. Niektórzy autorzy przy tym stawiają znak równości pomiędzy pojawieniem się hiperketonemii, a stanem podklinicznej ketozy (SCK – ang. *subclinical ketosis*), co nie do końca wydaje się właściwe zważywszy na duże zmienności w koncentracjach β-hydroksymaślanu (BHB) jako jej wyznacznika. W pewnych, potwierdzonych bowiem stanach subklinicznej ketozy krów, wskaźnik ten – uważany dotychczas za wyjątkowo czuły ich indykator jest niejednokrotnie niższy (ok. 1,0 mmol/l) niż przyjęte powszechnie poziomy referencyjne dla tego zaburzenia (> 1,2-1,4 mmol/l). Dlatego też, istnieje pilna potrzeba szerszej dyskusji naukowej na ten temat i jednoznacznego

zdefiniowania co jest podkliniczną ketozą, a co wyłącznie hiperketonemią bez wyraźnych konsekwencji zdrowotnych. Niniejsza praca wpisuje się też w tę szerszą polemikę i porusza nowe zagadnienia związane z hiperketonemią wyrażoną podwyższonym stężeniem BHB. Trzeba również pamiętać, że podwyższenie stężenia tego wskaźnika u krów mlecznych poza typowym podejrzeniem ketozy jest również wiązane z innymi zaburzeniami obejmującymi różnorodne stany zapalne organizmu, jak też łączone jest ze zmianami apoptotycznymi jego obumierających komórek, a także procesami degeneracji ustrojowej wielu narządów, w tym zwłaszcza wątroby w następstwie długotrwałego stresu oksydacyjnego.

Obecny zakres wiedzy nt. hiperketonemii w powiązaniu z patomechanizmem zmian w przebiegu SCK, a zwłaszcza dobrze poznanej i w miarę gruntownie przebadanej klinicznej formy ketozy bydła (CKet – ang. *clnical ketosis*), jest dość znaczący. Nie można zapominać jednak, że sam problem hiperketonemii oraz jej skutków dla utrzymania właściwej produkcyjności bydła mlecznego nie traci na znaczeniu, a niektóre jego aspekty wymagają nadal głębszego poznania i wyjaśnienia. W tym kontekście szczególną rolę należy przypisać mechanizmom przemian na poziomie molekularnym oraz ustaleniu najbardziej indykatorowych markerów genetycznych w przebiegu hiperketonemii oraz szerszego wykorzystania w celach diagnostycznych również innych bardziej rutynowych wskaźników, w tym biochemicznych i hematologicznych. Pozwoliłoby to o wiele skuteczniej niż dotychczas, w tym zwłaszcza przed porodem, wskazać potencjalnie wrażliwe osobniki na wystąpienie hiperketonemii i ograniczyć jej skutki. Praktycznym założeniem takiego postępowania byłoby szybsze przeciwdziałanie spodziewanym zaburzeniom i skuteczna minimalizacja ich skutków, a w konsekwencji poprawa rentowności w prężnie rozwijającym się ostatnio sektorze produkcji zwierzęcej jakim jest hodowla wysoko wydajnych krów mlecznych zwłaszcza rasy hf.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wpisuje się w ten ważny ogólny trend. Jej oryginalnym założeniem było zbadanie zachowania się wybranych parametrów molekularnych poprzez określenie ekspresji odpowiednich genów w wątrobie połączonej z oceną stopnia jej stłuszczenia oraz wskaźników biochemicznych i hematologicznych w okresie przejściowym u krów mlecznych rasy hf charakteryzujących się niższym (0,8-1,2 mmol/l) niż u osobników zwykle podejrzewanych o podkliniczną ketozę - stężeniem BHB. Cele szczegółowe

realizowane w pracy doktorskiej w odniesieniu do zasadniczego zadania obejmowały natomiast:

- ocenę ogólnego stanu klinicznego zwierząt na postawie 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 hf na poziom ekspresji genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową i peroksydazę glutationową w wątrobie.

Doktorantka dla realizacji postawionych sobie bardzo ambitnych celów badań posłużyła się przemyślanym schematem doświadczenia popartym dobrze dobranym nowoczesnym panelem metod badawczych, z których na szczególną uwagę zasługują zwłaszcza te z obszaru metod molekularnych. Całość badań przeprowadzono we własnym, uniwersyteckim ośrodku hodowlanym (Stacja Dydaktyczno-Badawcza Bałdy UWM w Olsztynie) gwarantując tym samym spełnienie wszelkich, obligatoryjnie wymaganych obecnie, kryteriów odnośnie dobrostanu zwierząt, a także zapewniając zwierzętom stałą kontrolę weterynaryjną oraz fachowy nadzór nad właściwym przebiegiem doświadczenia. W badaniach eksperymentalnych wykorzystano w sumie 23 krowy rasy hf (po drugiej laktacji; średnia wydajność 9500 kg mleka) podzielone na dwie grupy, tj. kontrolną (n=11) - stanowiącą zwierzęta zdrowe, które w okresie od tyg. przed do 3. tyg. po porodzie nie wykazywały podwyższonego stężenia BHB w surowicy oraz doświadczalną (n=12), w której badane zwierzęta w tym samym przedziale czasowym miały co najmniej raz stężenie BHB w surowicy w granicach od 0,9 do 1,4 mmol/l, a średnia jego koncentracja w pierwszych 3. tyg. po porodzie wynosiła ponad 0,8 mmol/l. Materiał badawczy, pozyskiwany od krów w okresie od tyg. przed do 9. tyg. po ich porodzie, stanowiła krew pełna i surowica gromadzona co tydzień oraz obrazy ultrasonograficzne wątroby (z 4. i 7. tyg. po porodzie) i podskórnej tkanki tłuszczowej okolicy zadu – BFT (ang. *backfat thickness*) archiwizowane w odstępach tyg., a także wycinki wątroby (z 4. i 7. tyg. po porodzie) pobierane drogą biopsji gruboigłowej pod kontrolą USG.

Dla osiągnięcia jak najbardziej wszechstronnego wglądu w kształtowanie się przemian ustrojowych w okresie przejściowym u krów mlecznych i oceny jego następstw w związku z towarzyszącym mu zwykle w takich przypadkach ujemnym bilansem energetycznym i hiperketonemią w podjętych badaniach Doktorantka zastosowała szeroki i zróżnicowany warsztat badawczy uwzględniający wiele aspektów związanych z omawianymi stanami. Warto podkreślić przy tym, że zastosowane metody badawcze, a zwłaszcza użycie bardzo nowoczesnej techniki ilościowej oceny stopnia ekspresji wybranych genów w wątrobie należy uznać za szczególnie pożądane i umożliwiające badania na bardziej zawansowanym poziomie, a w konsekwencji pozwalające uzyskać nowe, wartościowe rezultaty. W ramach zastosowanej techniki przeprowadzono wstępną izolację RNA z hepatocytów wątroby krów zgodnie zobowiązującym protokołem PureLink TM RNA, a następnie poddano go procesowi odwrotnej transkrypcji i reakcji amplfikacji w met. qRt-PCR dla wybranych genów kodujących trzy izoformy dyzmutazy ponadtlenkowej (SOD1, SOD2, SOD3) oraz peroksydazę glutationową typu 3 (CPX3). Ponadto, biorąc pod uwagę przyjęty w pracy doktorskiej profil prowadzonego doświadczenia nie mniej ważne były również podjęte badania biochemiczne, poprzedzone wcześniej rutynowym badaniem morfologicznym krwi, w którym wykorzystano bardzo rozbudowany panel wskaźników ocenianych w surowicy krwi krów, obejmujący analizę: stężenia glukozy, cholesterolu (CHOL), trójglicerydów (TG), wapnia (Ca), niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA) i β-hydroksymaślanu (BHB) oraz aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AST), aminotransferazy alaninowej (ALT), kinazy kreatynowej (CK), dehydrogenazy mleczanowej (LDH), fosfatazy alkalicznej (ALP), peroksydazy glutationowej (GSH-Px) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). W tym miejscu warto również wspomnieć o dużym zaangażowaniu i wiedzy praktycznej (instrumentalnej) Doktorantki związanej z pozyskiwaniem danych odnośnie ogólnej kondycji krów oraz stopnia utraty ich m.c. po porodzie (pomiar BFT) i nacieczenia tłuszczowego wątroby z wykorzystaniem ultrasonografii. Trudno nie docenić również Jej niewątpliwą biegłość praktyczną, którą Doktorantka musiała posiąść w celu przyżyciowego pobierania wycinków wątroby od krów dość wymagającą, inwazyjną metodą biopsji gruboigłowej prowadzoną ze względów bezpieczeństwa pod kontrolą USG, co wymagało też z Jej strony niemałego doświadczenia. Dla utrzymania wysokiego poziomu reprezentatywności końcowej

oceny stwierdzonych zmian uzyskane wyniki badań poddano szczegółowej analizie statystycznej z użyciem podwójnego oprogramowania: Python 3.10.0 i R 4.3.1.

W toku przeprowadzonych badań Doktorantce udało się wykazać, że w badaniach biochemicznych, w których stwierdzono szereg istotnych zmian, stężenie glukozy w grupie doświadczalnej było istotnie wyższe (7. tydzień po porodzie – p.p.), a wapnia niższe (9. tydzień p.p) niż w grupie kontrolnej. Z kolei w obu grupach krów po wycieleniu doszło do obniżenia stężenia trójglicerydów (TG), który w 2. tyg. p.p. u zwierząt grupy doświadczalnej był nawet istotnie niższy niż w kontrolnej. W przypadku zmian stężeń BHB, który wydaje się być szczególnie ważnym wskaźnikiem w kontroli hiperketonemii oraz ryzyka wystąpienia SCK i jej następstw należy podkreślić, że u zwierząt doświadczalnych w pierwszych trzech tyg. po porodzie parametr ten utrzymywał się na wysokim poziomie (0,888 – 0,904 mmol/l) i 3 tygodnie p.p. był jeszcze istotnie wyższy (0,888 mmol/l) niż w kontroli (0,560 mmol/l). Dla odmiany aktywność ALT i ASP w grupie doświadczalnej spadała istotnie po porodzie, a stężenia NEFA w tym czasie nie różniło się istotnie między grupami. Większe wartości SOD obserwowano w grupie doświadczalnej porównując je z kontrolną, a aktywność ALP wykazywała tylko istotne różnice w poszczególnych grupach zwierząt rozpatrywane w czasie trwania obserwacji bez widocznych zmian bezpośrednio pomiędzy nimi. Istotnych zmian pomiędzy grupami nie zanotowano również w stężeniach cholesterolu oraz aktywności CK, LDH i GSH-Px. W innych badaniach dotyczących oceny grubości podskórnej tkanki tłuszczowej u krów również nie wykazano statystycznie istotnych różnic między grupami przez cały okres doświadczenia, parametr ten wykazywał zaś istotne zmiany analizowane w danej grupie liniowo w czasie jego trwania. W podobnym badaniu ultrasonograficznym dotyczącym dla odmiany oceny stopnia stłuszczenia wątroby zmiany charakteryzujące 2. i 3. poziom stłuszczenia wykazano w grupie doświadczalnej, a odsetek krów z prawidłowym obrazem USG był generalnie wyższy w grupie kontrolnej. Szczególnie interesujące wyniki badań, zważywszy na unikalną molekularną ich metodykę, uzyskała Doktorantka oceniając ekspresję określonych genów w wątrobie i wykazując istotne różnice między grupami dla ekspresji SOD2 skorelowane przy tym z ekspresją SOD3.

Podsumowując, ważnym odkryciem, zwłaszcza z praktycznego punktu widzenia o dużym potencjale diagnostyczno-prognostycznym, było wykazanie, że u krów z utrzymującym się po porodzie wyższym stężeniem BHB (> 0,8 mmol/l) poziom

mobilizacji rezerw tłuszczowych nie odbiegał zasadniczo od stwierdzanego u osobników nie wykazujących tego podwyższenia. Kolejnym ważnym spostrzeżeniem było zaobserwowanie, że ocena aktywności ALT może być przydatnym alternatywnym wskaźnikiem różnicującym krowy narażone na negatywne skutki hiperketonemii, u których pierwotnie nie wystąpił podwyższony poziom BHB wskazujący na SCK. Szczególnie obiecującym zaś odkryciem Doktorantki było wykazanie, że ocena poziomu transkrypcji wybranych genów, zwłaszcza SOD2 może być z powodzeniem w przyszłości szerzej wykorzystywana jako przydatny biomarker ketozy u krów. Ponadto, analiza ekspresji odpowiednio dobranych innych genów może być pomocna do określenia możliwości regeneracyjnych wątroby u krów po wystąpieniu ketozy, zwłaszcza w stanach zaburzeń metabolizmu ustrojowego prowadzącego w konsekwencji do poważnych następstw na skutek stresu oksydacyjnego.

Owocem przeprowadzonych badań było przygotowanie rozprawy doktorskiej prezentującej szczegółowo jej wyniki, pokrótce już omówione wyżej, zredagowanej w klasycznej formie jako „manuskrypt książki" zgodnie z wytycznymi ustawy z dn. 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) art. 187. Oceniana rozprawa doktorska zawiera 95 stron tekstu poprzedzonego wykazem skrótów stosowanych w pracy i podzielonego na kolejne rozdziały takie jak, wykaz tabel i rycin, streszczenie w polskiej i anglojęzycznej wersji, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, omówienie wyników, wnioski i piśmiennictwo (przedstawione na 11 stronach i liczące w sumie 108 pozycji). Wyjątkowo bogata dokumentacja graficzna wyników badań przedstawiona została w postaci 18 rycin i 15 tabel zamieszczonych bezpośrednio w tekście pracy.

Tytuł przedstawionej do recenzji dysertacji doktorskiej odzwierciedla zasadniczy cel zaplanowanych badań, którego czteropunktowe rozwinięcie obejmujące bardziej szczegółowo sprecyzowane zadania badawcze, realizowane następnie konsekwentnie z zachowaniem przyjętej chronologii pozwoliło niewątpliwie na jego osiągnięcie. Odpowiednie jednak sprecyzowanie celu badań nie byłoby możliwe bez głębokiej wiedzy w temacie reprezentowanym przez Doktorantkę. Znalazło to swoje odbicie w bardzo konkretnie przedstawionym wstępie pracy doktorskiej (6 stron maszynopisu), w której Doktorantka bardzo szczegółowo nakreśliła rolę metabolicznych mechanizmów adaptacyjnych krów mlecznych w okresie przejściowym, który jest kluczowym momentem dla dobrostanu, produkcyjności i

statusu zdrowotnego tych zwierząt zwłaszcza, że towarzyszy im obok wielu stricte typowo metabolicznych zmian również szereg o charakterze fizjologicznym, a nawet immunologicznym i neuro-hormonalnym. Nie mniej ważnym poruszanym też we wstępie dysertacji opisywanym szerzej problemem był aspekt hiperketonemii krów i jej przyczyn oraz następstw, a także pewnych spotykanych często kontrowersji związanych z jej laboratoryjną diagnostyką opartą na badaniach poziomu ciał ketonowych, w tym zwłaszcza stężeń BHB oraz właściwej interpretacji uzyskanych wyników. Niektóre zdawałoby się jednoznaczne dane w konfrontacji z przyjętymi wartościami referencyjnymi oceniane są bowiem często na pograniczu fizjologii i patologii, a wyciągane na ich podstawie wnioski nie są wiążące i ograniczają skuteczność ewentualnego postępowania zapobiegawczego. Problem pogłębia również fakt dużej zmienności w kształtowaniu się poszczególnych wskaźników u osobników o wysokim poziomie produkcji bardziej podatnych na wszelkiego rodzaju odstępstwa i wpływy ewentualnych rozwijających się patologii. Dlatego też, tak ważny jest odpowiedni dobór badanych wskaźników diagnostycznych wraz z ich oceną i wiarygodną interpretacją, a także właściwie dobrany warsztat badawczy z wykorzystaniem nowych, bardziej miarodajnych, nowoczesnych metod rozpoznawczych. Na tym polu wydają się interesujące i potencjalnie godne uwagi, nowe metody służące do diagnostyki zaburzeń okresu przejściowego u krów w powiązaniu z towarzyszącą mu hiperketonemią, SCK i CKet. Metody te, w tym zwłaszcza bazujące na wykorzystaniu najbardziej indykatorowych markerów genetycznych i biochemicznych mogłyby być w niedalekiej przyszłości wykorzystywane szerzej również w praktyce hodowlanej do badań podejmowanych u ciężarnych krów zagrożonych hiperketonemią jeszcze przed porodem oraz jako wsparcie w kompleksowym postępowaniu weterynaryjnym poprzedzonym odpowiednim rozpoznaniem, a następnie, kolejnymi działaniami przeciwdziałającymi powstaniu spodziewanych zaburzeń metabolicznych.

Tym zagadnieniom poświęciła się szerzej Kandydatka w swojej pracy doktorskiej. Do oceny statusu zdrowotnego krów z podwyższonym poziomem BHB tradycyjnie podejrzewanych o wystąpienie SCK wykorzystała dostępny panel stosowanych rutynowo metod hematologicznych oraz biochemicznych o znacznie rozszerzonym w tym przypadku zakresem ocenianych wskaźników (w sumie aż 11), a przede wszystkim zastosowała nowoczesną metodę molekularnej oceny poziomu ekspresji wybranych genów w wątrobie.

Zaprezentowane w pracy doktorskiej efekty nowej metodologii badawczej skłaniają do przyjęcia tezy o zdecydowanie korzystnym i trafnie dobranym profilu badanych wskaźników, który pozwolił uzyskać interesujące wyniki dowodząc o dużym potencjale poznawczym i aplikacyjnym podjętych badań. W wyniku wykonanych badań Doktorantce udało się wykazać, że wysokie stężenie β-hydroksymaślanu (BHB) u krów nie ma w zasadzie większego wpływu na charakter zmian morfologicznych we krwi tych zwierząt, stąd typowe badania hematologiczne zastosowane w tym przypadku były mniej przydatne i niewiele wniosły w szerszej analizie zasadniczych tez dysertacji. Z kolei badania biochemiczne dotyczące oceny aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) w surowicy zwierząt okazały się w pełni przydatne i mogą być nawet polecane w procesie różnicowania krów narażonych na negatywne skutki hiperketonemii. Ponadto, jak wykazano utrzymujące się wyższe stężenie BHB u krów po porodzie powoduje też podwyższenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), natomiast nie wpływa ono istotnie na aktywność peroksydazy glutationowej (GSH-Px). Warto w tym miejscu podkreślić również, że krowy z utrzymującym się wyższym stężeniem BHB po porodzie (powyżej 0,8 mmol/l) charakteryzują się podobnym poziomem mobilizacji rezerw tłuszczowych jak te, u których takich zmian nie stwierdzono. W kontekście szerszego wykorzystania w praktyce metod molekularnych użytych w pracy doktorskiej jako ewentualnej, nowej składowej nowoczesnej diagnostyki w patologii okresu przejściowego u krów mlecznych związanej m.in. z nadmierną mobilizacją tłuszczu i towarzyszących jej zaburzeń przemian lipidowych organizmu oraz rozwojem hiperketonemii, subklinicznej i klinicznej ketozy trzeba stwierdzić, że materiał zastosowany do takich badań w postaci RNA izolowanego z wątroby krów podejrzanych o w/w zaburzenia jest w pełni wartościowy. Jak wykazano bowiem, stwierdzana zwykle w przebiegu omawianych zaburzeń obecność cech tłuszczowego nacieczenia hepatocytów nie wpływa na jakość i przydatność analityczną wybranej matrycy badawczej. Jest to szczególnie ważne w przypadku kiedy Doktorantka w swoich oryginalnych badaniach będących przedmiotem pracy doktorskiej wykazała, że wyniki analiz molekularnych wskazują na możliwość wykorzystania oceny poziomu transkrypcji genów, w szczególności SOD2 jako potencjalnego swoistego biomarkera stopnia nasilenia ketozy u krów. Ponadto, analiza ekspresji genów może być też wykorzystana w procesie oceny przyżyciowego potencjału regeneracyjnego wątroby u krów po

wystąpieniu ketozy, w szczególności w odniesieniu do zaburzonego metabolizmu powodującego stres oksydacyjny.

Biorąc pod uwagę powyższe należy stwierdzić, ze recenzowana praca doktorska stanowi ważny wkład Autorki na etapie poszukiwania nowych rozwiązań w poprawie efektywności stosowanych dotychczas metod w diagnostyce i poznawaniu mechanizmów przemian metabolicznych krów okresu przejściowego związanych z występowaniem zjawiska hiperketonemii i jego zdrowotnych następstw. Warto przy tym podkreślić, że uzyskane efekty były możliwe nie tylko dzięki dobrze dobranemu warsztatowi badawczemu i głęboko przemyślanej metodyce doświadczenia ale również rozeznaniu i indywidualnej wiedzy Doktorantki w zakresie uprawianej przez nią tematyki naukowo-badawczej. W odniesieniu do zasadniczych założeń metodycznych pracy doktorskiej Autorka właściwe dobrała odpowiedni materiał eksperymentalny bazując na rasie bydła mlecznego hf najbardziej obecnie poszukiwanej w nowoczesnej hodowli uwzględniając ich wyjątkową specyfikę rasową i nadprzeciętne zdolności produkcyjne. Swoimi badaniami Doktorantka objęła przy tym ważną i mniej poznaną dotychczas grupę zwierząt, w której analizowane koncentracje BHB stwarzały pewne problemy w końcowej interpretacji ocenianych stanów klinicznych krów rzucając więcej światła na artykułowane przez wielu autorów wątpliwości i przyczyniając się ostatecznie do poprawy kryteriów właściwej diagnozy. Tak przemyślany dobór materiału badawczego, pozwolił jak zakładano na bardziej miarodajną analizę rzeczywistego stanu zdrowotnego analizowanych zwierząt, a w rezultacie na wyciągnięcie interesujących wniosków o bardziej aplikacyjnym charakterze. Warto zwłaszcza to podkreślić, kiedy dotychczasowe dostępne dane literaturowe w tym zakresie są niewystarczające i często niejednoznaczne. Jest to szczególnie ważne również w przypadku gdy wiarygodna ocena rzeczywistych zależności na płaszczyźnie: umiarkowane zmiany stężenia BHB w surowicy krów okresu przejściowego, a ich aktualny stan zdrowotny - zależna jest od sposobu interpretacji wyników bieżących badań lab. BHB i przyjętych dla tego wskaźnika wartości referencyjnych. Sam wskaźnik zaś i jego wahania wynikać mogą też z aktualnej sytuacji w zakresie bilansu energetycznego w danej populacji bydła, stanu odżywienia i technologii chowu bydła, a nawet z indywidulanej skłonności poszczególnych zwierząt do rozwoju zaburzeń metabolicznych na etapie nadmiernej mobilizacji tłuszczu i określonych konsekwencji z tym związanych. Dlatego też, przyjęta przez Doktorantkę tematyka pracy doktorskiej i jej założenia są obecnie

szczególnie pożądane i potrzebne dla praktyki, a jej bezspornie aplikacyjny charakter może posłużyć do opracowania w przyszłości bardziej skutecznych programów ograniczania zachorowań u krów okresu przejściowego, a nawet stać się punktem wyjścia do opracowania podstaw kompleksowego postępowania zapobiegawczego popartego wykorzystaniem bardziej miarodajnych, nowoczesnych metod diagnostycznych, w tym również metod molekularnych. Otrzymane dotychczas wyniki zaprezentowane w dysertacji dają taką szansę ale wymagają one jeszcze szerszego potwierdzenia w praktyce hodowlanej.

Badania wykonane przez Doktorantkę w sposób wnikliwy dokumentują omawiane wyżej aspekty nie tylko natury stricte naukowo-badawczej, ale mają one przy tym duży potencjał aplikacyjny oraz wskazują na nowe kierunki zmian i tendencje w przyszłych modelach diagnostycznych i aktualnie preferowanych sposobach interpretacji uzyskiwanych wyników. Pozwoliły one ponadto poznać złożoność wielu zjawisk okresu przejściowego u krów narażonych na hiperketonemię w kontekście szerszego wglądu w mechanizmy przemian biochemicznych, jak też, co jest szczególnie interesujące, na poziomie subkomórkowych reakcji molekularnych, związanych z ekspresją wybranych genów indykatorowych w wątrobie zwierząt. Dotychczasowe dane literaturowe na ten temat były niewystarczające, a podjęcie przez Doktorantkę tego wyzwania i jego realizacja w trudnych, szczególnie wymagających warunkach terenowych pozwoliła uzyskać ostatecznie wiarygodne i przydatne dane. O właściwym ukierunkowaniu badań świadczą m.in. uzyskane wyniki, które pozwoliły Autorce na sformułowanie aż 7 wniosków, które przedstawione zostały w dostatecznie syntetycznej choć może w niektórych przypadkach w zbyt ogólnej formie (np. dla wniosku nr 6, który nie podaje jakie były właściwie, te szczegółowe, wyniki analiz molekularnych wskazujące w konkluzji na ich przydatność diagnostyczną ? czy też treść 7-mego wniosku o bardziej deklaratywnym wydźwięku?) podsumowującej - prawie wszystko (brak np. odpowiedzi w postaci niezależnego wniosku jakie były cechy i zakres tłuszczowego nacieczenia wątroby ?) co udało się w pracy wykazać. Wykonane badania wnoszą dużo do rozszerzenia wiedzy o analizowanych zjawiskach i pozwoliły poznać ich specyficzne aspekty.

Z obowiązku Recenzenta należy jednak zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia i uchybienia, których nie ustrzegła się Autorka w trakcie przygotowywania dysertacji

doktorskiej (część już pokrótce przytoczono), w większości jednak natury stylistyczno-porządkowej (np. na str. 8 w Wykazie tabel w zapisie: *Tabela 14. Wyniki testu U Manna-Whitneya dla porównania ekspresji....* itd. błędnie zapisano w **4 tygodniu** zamiast w **7 tygodniu po porodzie**. Z kolei w nazwie: *Tabela 11. Odsetek krów „w" cechami tłuszczowego nacieczenia...* itd. zapisano „w" zamiast **„z"** cechami ..... i ten sam błąd pojawia się w nazewnictwie tab. również na str. 68), a tylko niektóre o bardziej merytorycznym charakterze, których korekta byłaby wskazana przed ostatecznym wysłaniem pracy do druku. Poniżej, niektóre z nich:

1. Już na wstępie pewne wątpliwości natury językowej budzi przyjęta w tytule dysertacji nazwa rasy krów hf pisana **dużą literą...** tj. „Wpływ podwyższonego stężenia β-hydroksymaślanu w surowicy **krów rasy Holsztyńsko-Fryzyjskiej** ...itd. „. zwłaszcza, że nawet w tej samej pracy doktorskiej na jej stronie tytułowej u dołu podano informację o projekcie NCN, z którego środków finansowano realizację badań pracy doktorskiej, którego tytuł brzmiał: *„Analiza transkryptomu wątroby u krów **rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej** przy użyciu techniki AMPLI-seq"* gdzie widać wyraźnie, że nazwę rasy pisano małą literą i zdaje się, że ta forma jest bardziej właściwa.
2. W przypadku 6 i 7-go z zaprezentowanych w pracy doktorskiej wniosków ich charakter jest bardziej ogólnej i deklaratywnej natury nie do końca wypływa z uzyskanych konkretnych wyników i założonych szczegółowych celów pracy. Warto byłoby rozważyć bardziej krytycznie ich treść i ewentualnie przeredagować, uszczegółowiając je najlepiej pod kontem konkretnych danych.
3. W dołączonym do pracy piśmiennictwie źródłowym pewne pozycje **nie mają swoich bezpośrednich cytowań w tekście** (w sumie 3; przytoczone poniżej) inne **różnią się datą wydania** (np. DEODATO F., BOENZI S., SANTORELLI F. M., DIONISI-VICI C. (**2006**), a w tekście na str. 21 - **2004** r.; TANAKA A., URABE S., TAKEGUCHI A., MIZUTANI H., SAKO T., IMAI S., YOSHIMURA I., KIMURA N., ARAI T. (**2006**) a na str. 77 – **2011** r.; VAN ROSSUM G., DRAKE JR F.L. (**1995**) na str.46 - **2009** r.). Z kolei dla pozycji autorstwa: TIENKEN R., KERSTEN S., FRAHM J., MEYER U., LOCHER L., REHAGE J., HUBER K., KENÉZ Á., SAUERWEIN H., MIELENZ M., DÄNICKE S. (**2015**) brakuje dopisku w postaci liter "**b**" (patrz str. 24). We wszystkich tych wymienionych przykładach konieczna jest weryfikacja i korekta podanych danych.

- MOSTERT P.F., BOKKERS E.A.M., VAN MIDDELAAR C.E., HOGEVEEN H., DE BOER I.J.M. (2018) *Estimating the economic impact of subclinical ketosis in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model* Animal 12: 145-154. DOI: 10.1017/S1751731117001306

- PUTMAN A.K., BROWN J.L., GANDY J.C., WISNIESKI L., SORDILLO L.M. (2018) *Changes in biomarkers of nutrient metabolism, inflammation, and oxidative stress in dairy cows during the transition into the early dry period* Journal of Dairy Science 101: 9350–9359. DOI: 10.3168/jds.2018-1459.

- STEENEVELD W., AMUTA P., VAN SOEST F.J.S., JORRITSMA R., HOGEVEEN H. (2020) *Estimating the combined costs of clinical and subclinical ketosis in dairy cows* PLoS One 15: e0230448. DOI: 10.1371/journal.pone.0230448

Dodatkowo w odniesieniu do cytowanej w tekście pozycji piśmiennictwa na str. 23 wers 2 od dołu z podanym tu nazwiskiem autora: McArt**K** i wsp. 2012 pisanym prawdopodobnie błędnie, tj. razem z literą **K** - jeżeli porównamy to z danymi zawartymi w pozycji 58 omawianego piśmiennictwa.

Wspomniane i zawarte w tekście uwagi nie mają jednak istotnego wpływu na ogólną pozytywną ocenę przygotowanej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że recenzowana rozprawa doktorska wnosi nowe, istotne dane do nauki i w sposób znaczący pogłębia wiedzę z zakresu kształtowania się mechanizmów przemian metabolicznych okresu przejściowego u wysoko wydajnych krów mlecznych rasy hf narażonych na występowanie subklinicznej ketozy i hiperketonemii z różnie interpretowanym referencyjnym stężeniem β-hydroksymaślanu uznawanym za ich potencjalny biomarker. W realizacji dysertacji doktorskiej Pani lek. wet. Dominika Grzybowska dobrze wywiązała się z postawionego sobie zadania, doświadczenia zaplanowała prawidłowo i dokładnie je wykonała, przy użyciu powszechnie akceptowanych i aktualnych metod badawczych, gwarantujących wiarygodność uzyskiwanych wyników, a zamieszczona w pracy szczegółowa dokumentacja graficzna z przeprowadzonych badań jest jasna, czytelna i ułatwia czytającemu skuteczną weryfikację wyników badań. Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pani **lek. wet. Dominiki Grzybowskiej** pt. ***„Wpływ podwyższonego stężenia β-hydroksymaślanu w surowicy krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej na poziom ekspresji wybranych genów w wątrobie”*** odpowiada warunkom określonym w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.

*Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) i może stanowić podstawę do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria. W związku z powyższym wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria UWM w Olsztynie o dopuszczenie lek. wet. Dominikę Grzybowską do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Dariusz Bednarek