

Puławy, 2023.06.16

prof. dr hab. Dariusz Bednarek

Zakład Chorób Bydła i Owiec

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

w Puławach

OCENA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Huberta Gorzkosia**
pt. „**Wpływ podawania probiotyków u krów mlecznych w okresie zasuszenia,
okołoporodowym i wczesnej laktacji oraz u ich potomstwa,
na wybrane parametry komórkowej odpowiedzi immunologicznej**”

przygotowanej w Katedrze i Klinice Rozrodu Zwierząt
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
pod kierunkiem **dr hab. Piotra Brodzkiego, prof. uczelni**

Recenzję opracowano w oparciu o uchwałę Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 27 kwietnia 2023 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauki weterynaryjne w dyscyplinie weterynaria lek. wet. Hubertowi Gorzkosiovi.

Praca wpisuje się w nowy, szeroko obecnie propagowany trend szerszego wykorzystania prozdrowotnych właściwości mikroorganizmów probiotycznych, a także prebiotyków i synbiotyków w utrzymaniu odpowiedniego stanu zdrowia zwierząt gospodarskich w dobie całkowitego wycofania w 2006 r. z hodowli zwierząt w UE tzw. antybiotykowych stymulatorów wzrostu (ASW). Trend ten obejmuje różne gatunki zwierząt gospodarskich i zakłada, poprzez alternatywne działania chronić zdrowie zwierząt w ramach szeroko pojętego ich dobrostanu, a w rezultacie też zdrowie człowieka jako konsumenta produktów spożywczych zwierzęcego pochodzenia. Stan zdrowia zwierząt gospodarskich oraz to czym są karmione i suplementowane przekłada się bowiem bezpośrednio na jakość i bezpieczeństwo produktów od nich pozyskiwanych, a ostatecznie też człowieka jako końcowego ogniwa w łańcuchu żywieniowym. Dotychczasowe praktyki przed wprowadzeniem zakazu stosowania antybiotykowych promotorów wzrostu przyczyniły się niestety do powstania i rozprzestrzenienia zjawiska antybiotykoodporności mikroorganizmów, jak

również przedostawania się pozostałości antybiotyków do żywności i surowców pochodzenia zwierzęcego. Powstała zatem, pilna potrzeba znalezienia alternatywnych, równie efektywnych, a przy tym bezpiecznych rozwiązań zastępujących dotychczasowe sposoby działania. Taką skuteczną alternatywą okazały się preparaty zawierające bakterie probiotyczne oraz inne „zamienniki” pochodzenia biologicznego (prebiotyki, synbiotyki), jak też cała gama różnorodnych aktywnych dodatków paszowych, takich jak kwasy organiczne i ich sole, fitoncydy i enzymy. Na przestrzeni lat probiotyki stosowano już w zasadzie u wszystkich znanych gatunków zwierząt gospodarskich oraz towarzyszących (psy, koty, konie), a nawet u zwierząt akwakultury (ryby, krewetki) i niektórych owadów użytkowych (pszczoły). Biologiczne działanie probiotyków jest jednak dość zróżnicowane i zależne nie tylko od docelowego gatunku zwierząt, ale również miejsca ich działania oraz aktualnego stanu funkcjonalnego i poziomu przemian fizjologicznych organizmu. Główne jednak działanie probiotyków opiera się na modyfikowaniu składu mikrobioty jelitowej polegającej ogólnie rzecz biorąc na regulacji liczebności i zachowaniu dynamicznej równowagi pomiędzy składem mikroflory korzystnej i szkodliwej dla organizmu. U przeżuwaczy domowych takich jak bydło praktyczne zastosowanie probiotyków obejmuje w zasadzie dwie grupy produkcyjne, tj. krowy mleczne i opasy. W przypadku tych zwierząt korzystne efekty zaobserwowano zwłaszcza u krów mlecznych, u których podawanie probiotyków zwiększało ich wydajność produkcyjną zarówno co do ilości, jak i jakości wyprodukowanego mleka. Mechanizm działania probiotyków w tym przypadku koncentrował się m.in. na poprawie zdolności do adherencji korzystnych bakterii przewodu pokarmowego do nabłonka jelit na etapie ich współzawodnictwa z mikroflorą patogenną, przechwytywania składników pokarmowych, produkcji aktywnych substancji bakteriostatycznych oraz wpływu na ogólną odporność organizmu. Ta ostatnia właściwość jest jednak jak dotychczas słabo poznana w odniesieniu do krów mlecznych. Na zasadzie analogii, można spodziewać się jednak, podobnie jak u ludzi i zwierząt laboratoryjnych (myszy), u których to już wykazano, korzystnego wpływu probiotyków na odporność komórkową związaną z funkcjami limfocytów T i B oraz z produkcją i uwalnianiem odpowiednich cytokin. Dotychczas jednak dane te w przypadku krów mlecznych są wysoce niewystarczające i wymagają dalszych kompleksowych badań zwłaszcza w okresach specyficznych dla tych zwierząt związanych z okresem zasuszenia, około-

porodowym i laktacji oraz wpływem probiotyków stosowanych w czasie ciąży na potomstwo i bezpośrednio po urodzeniu na cielęta w okresie ich odchowu.

W tym celu Doktorant w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej podjął badania, w których zastosował odpowiedni preparat probiotyczny u krów mlecznych w różnych okresach ich życia (ciąża i okres zasuszenia, laktacja) w postaci dodatku do paszy i prześledził jego wpływ na wybrane parametry odporności komórkowej u tych zwierząt oraz u ich potomstwa. Ponadto, ocenił wpływ podawanych probiotyków w analogicznym kierunku stosowanych bezpośrednio u cieląt nowo narodzonych (w okresie od 3 do 120 dnia życia) pochodzących od wcześniej przebadanych krów (mamek).

Całość zaplanowanych badań wykonano na 20 klinicznie zdrowych ciężarnych krowach rasy Hf będących w końcowym okresie laktacji (przed zasuszeniem) o średniej wydajności mlecznej w stadzie od 7,200 do 8,720 kg mleka na krowę w 305-dniowym okresie laktacji oraz na 20 cielętach nowo narodzonych pochodzących od tych krów. W badaniach z całej stawki wybranych zwierząt wydzielono jako punkt odniesienia po 10 krów i 10 cieląt kontrolnych. Preparat probiotyczny (EM-Probiotyk, Greenland Technology EM, Trzcianki, Poland o składzie: *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* i *Rhodopseudomonas palustris* oraz melasa trzcinowa – jako dodatek smakowy) podawano krowom z paszą (TMR) w ilości 200 ml/zw./dz. tuż przed rozpoczęciem doświadczenia, tj. bezpośrednio przed zasuszeniem krów i kontynuowano to aż do 12 tygodnia po ich porodzie. Z kolei u cieląt nowo narodzonych początkowa dawka preparatu podawana cielętom od 3 dnia ich życia przez okres pierwszego miesiąca wynosiła 100 ml/zw./dz., a następnie została zmniejszona o połowę (50 ml/zw./dz) i stosowana dalej do końca trwania doświadczenia, tj. do ukończenia przez te zwierzęta 120 dnia życia. Trzeba przy tym pamiętać, że w przypadku pełnej oceny zastosowanego dodatku preparatu probiotycznego na organizm zwierzęcia nie mniej ważne jest również skonfrontowanie i przeanalizowanie jego wpływu pod kątem składu całej, stosowanej w żywieniu zwierząt badanych dawki pokarmowej, która mogłaby mieć też pośredni wpływ na końcowy efekt samego dodatku. Dlatego też, Doktorant zdając sobie z tego sprawę i przeciwdziałając ewentualnym wątpliwościom z tym związanym zastosowaną u bydła dietę opisał bardzo szczegółowo i wyczerpująco. Ponadto, należy zaznaczyć, że rodzaj żywienia krów na fermie pod względem ilości i jakości dostosowywano na bieżąco uwzględniając aktualną wydajność produkcyjną i okres

cięży zwierząt aby zniwelować w porę ewentualne niedobory energii i dostarczyć im odpowiednich, potrzebnych do dobrego funkcjonowania organizmu ciężarnej krowy i rozwoju płodu, składników pokarmowych. Materiałem do planowanych badań immunologicznych była krew obwodowa pobierana w różnych okresach życia zarówno od krów, jak też pochodzących od nich cieląt po urodzeniu. U krów miało to miejsce w dniu doboru zwierząt do badań, tj. 7 dni przed zasuszeniem oraz 14 dni przed i 7, 21, 60 i 90 dni po porodzie. Natomiast u potomstwa krew pobierana była 48 godzin po urodzeniu cieląt, a następnie w 21, 60 i 120 dniu ich życia.

Dla osiągnięcia w miarę jak najbardziej wszechstronnego wglądu w kształtowanie się odporności komórkowej u badanych zwierząt Doktorant zastosował szeroki i zróżnicowany warsztat badawczy uwzględniający wiele jego aspektów. Warto podkreślić przy tym, że zastosowane metody badawcze, a zwłaszcza użycie bardzo nowoczesnej obecnie techniki cytometrii przepływowej (FCM) należy uznać za wyjątkowo dobrze przemyślany i pożądany wybór, jeżeli oczekujemy adekwatnych i wiarygodnych wyników badań z zakresu immunologii. W ramach wykonanych badań użycie techniki cytometrii przepływowej obejmowało ocenę aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów krwi obwodowej zwierząt (Phagotest) oraz zdolności bakteriobójczych tych komórek fagocytujących drogą wybuchu tlenowego w odniesieniu do pochłoniętych drobnoustrojów (Bursttest), a także nie mniej ważnego aspektu odpowiedzi komórkowej jakim jest szczegółowe fenotypowanie poszczególnych subpopulacji leukocytów krwi obwodowej wykazujących ekspresję specyficznych receptorów powierzchniowych takich jak: CD14 (limfocyty T pomocnicze; Th), CD8 (limfocyty T cytotoksyczne/supresorowe; Tc/s), CD11b (podjednostka receptora integryny α M), CD18 (podjednostka receptora integryny β 2), CD21 (limfocyty B), CD25 (łańcuch alfa receptora interleukiny 2) i Foxp3 (limfocyty T-regulatorowe). Dodatkowo Doktorant przeprowadził też badania ważnego, a przy tym szczególnie indykatorowego dla bydła, czynnika odpowiedzi ostrej fazy (OOF) jakim jest surowiczy amyloid A (SAA). Trzeba podkreślić, że parametr ten został dobrany właściwie bowiem obok haptoglobiny (Hp) jest on uważany, jako tzw. białko ostrej fazy (bof), za jedno z najbardziej czułych i wiarygodnych w ocenie OOF u bydła. Dla utrzymania wysokiego poziomu reprezentatywności końcowej oceny stwierdzonych zmian uzyskane wyniki badań poddano szczegółowej analizie statystycznej z użyciem oprogramowania Statistica (wersja 10.) oraz jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA).

W toku przeprowadzonych badań Doktorantowi udało się wykazać, że stosowanie poddanego ocenie preparatu probiotycznego u krów ma aktywujący wpływ na zdolności fagocytarne oraz bakteriobójcze komórek fagocytyujących obecnych we krwi obwodowej tych zwierząt. Ponadto, widocznemu zwiększeniu uległy wartości odsetka ważnych immunologicznie subpopulacji komórek krwi, takie jak limfocyty T-regulatorowe (Foxp3), T-pomocnicze (CD4+) i B (CD21+) oraz komórki wykazujące ekspresję dla integryny $\beta 2$ (CD18+) i αM (CD11b), warto też podkreślić, że zaobserwowane zmiany utrzymywały się do końca prowadzonego doświadczenia. Tego typu reakcje organizmu w następstwie podawania badanego probiotyku u krów mogą świadczyć wg Doktoranta o pewnych zdolnościach do aktywacji mechanizmów regulatorowych zarówno w obrębie odporności komórkowej, jak też humoralnej o wrodzonym lub też nabytym w czasie charakterze. O zdecydowanie immunomodulującym kierunku oddziaływania stosowanego probiotyku może świadczyć też zachowanie się kolejnego badanego wskaźnika jakim był SAA. Wskaźnik ten przez cały czas badań utrzymywał się na stosunkowo niskim poziomie wskazując na brak nadmiernej odpowiedzi organizmu w następstwie podawania probiotyku, która w przypadku nadreaktywności immunologicznej wyraża się zwykle wzmożoną reakcją zapalną co mogłoby być niekorzystne dla jego właściwego funkcjonowania. Jest to szczególnie ważne zwłaszcza w tak newralgicznych okresach życia krów mlecznych jakimi są ciąża i wczesna laktacja istotnie, same w sobie, obciążające organizm zwierzęcia oraz zwiększające ich podatność na różne choroby w tym zakaźne. Podawanie probiotyku u krów ciężarnych miało też korzystny wpływ, jak zaobserwowano, na odporność u ich potomstwa, jak też u cieląt starszych otrzymujących ten dodatek do paszy po urodzeniu. Doktorant wykazał, że u cieląt otrzymujących probiotyk miał miejsce istotny wzrost odsetka limfocytów TCD4+, limfocytów BCD21+, aktywowanych limfocytów BCD25+ oraz integryn $\beta 2$ (CD18+) i αM (CD11b). Wyniki te wskazywać mogą na szybszą adaptację układu immunologicznego tych zwierząt, u których jednak z racji braku w zasadzie zmian w liczebności komórek Foxp3 trudno mówić o funkcjach regulatorowych tak znacząco wyrażonych dla odmiany u zwierząt dorosłych.

Owocem przeprowadzonych badań było przygotowanie rozprawy doktorskiej 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 75 stron tekstu

poprzedzonego wykazem skrótów stosowanych w pracy i podzielonego na kolejne rozdziały takie jak, wstęp, cel badań, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, literatura (przedstawiona na 16 stronach i licząca w sumie 186 pozycji) oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Dokumentacja graficzna wyników badań przedstawiona została w postaci 3 rycin i 8 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 Doktoranta. Znalazło to swoje odbicie w bardzo szczegółowym i obszernym potraktowaniu wstępu pracy doktorskiej (16 stron maszynopisu), w której Doktorant bardzo szeroko nakreślił rolę przemian metabolicznych krów mlecznych omawiając m.in. aspekty okresu przejściowego z ujemnym bilansem energii, kolostrogenezą i lakotegenezą oraz inne stany, często na pograniczu fizjologii i patologii, ważne dla organizmu krowy. Trzeba też pamiętać, że jest to szczególnie ważne u osobników o wysokim poziomie produkcji bardziej podatnych na wszelkiego rodzaju odstępstwa i patologie przekładające się w konsekwencji na zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu różnych układów organizmu w tym immunologicznego czy neuro-hormonalnego. Wymagają one przy tym skutecznej interwencji i szybkiej regulacji z zewnątrz, a dotyczą zarówno samych krów, jak też ich potomstwa. Na tym polu wydają się przydatne i potencjalnie godne uwagi, wykorzystywane szerzej również w praktyce hodowlanej, dostępne obecnie na rynku w szerokim asortymencie różnego rodzaju dodatki żywieniowe, a zwłaszcza preparaty zawierające mikroorganizmy probiotyczne (probiotyki).

Zaprezentowane w pracy doktorskiej efekty stosowania probiotyków skłaniają również do przyjęcia tezy o zdecydowanie korzystnym oddziaływaniu tych dodatków na procesy odpornościowe u krów i ich potomstwa głównie poprzez istotny wpływ na aktywację i poprawę funkcjonowania procesów regulatorowych w układzie immunologicznym tych zwierząt. Praca ta jest więc ważnym wkładem Autora w poszukiwanie nowych rozwiązań w poprawie statusu zdrowotnego bydła szczególnie pożądanego w dobie poszukiwania alternatywnych metod zastępujących dotychczasowe, oparte na nadużywaniu preparatów antybakteryjnych również w

postaci tzw. promotorów wzrostu. Warto podkreślić, że uzyskane efekty były możliwe nie tylko dzięki dobrze dobranemu warsztatowi badawczemu i przemyślanej metodyce doświadczenia ale również rozeznaniu i indywidualnej wiedzy Doktoranta w zakresie obowiązujących obecnie tendencji w obszarze szeroko pojętej profilaktyki chorób zwierząt również poprzez wpływ na mikrobiotę organizmu. W odniesieniu do zasadniczych założeń metodycznych pracy doktorskiej Autor właściwie dobrał odpowiedni materiał eksperymentalny bazując na rasie bydła mlecznego Hf najbardziej obecnie pożądanej w nowoczesnej hodowli uwzględniając ich wyjątkową specyfikę rasową i nadprzeciętne zdolności produkcyjne. Ponadto, rozszerzył On badania na różne grupy wiekowe zwierząt, tj. poza bydlęciem dorosłym (krowy) również na potomstwo i cielęta starsze w okresie odchowu zwiększając tym samym istotnie możliwości skutecznej i wiarygodnej końcowej oceny porównawczej pomiędzy zróżnicowanymi grupami zwierząt otrzymującymi i pozbawionymi dodatku probiotyku. Dobór ten, jak zakładano i potwierdzono również w badaniach, pozwolił na bardziej miarodajną analizę rzeczywistego statusu immunologicznego krów (matek) i ich potomstwa oraz cieląt starszych w relacji z zastosowaną suplementacją probiotyczną, a w rezultacie, pozwolił też na wyciągnięcie interesujących wniosków o bardziej aplikacyjnym charakterze. Warto 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 statusu odpornościowy krowy – matki suplementowanej preparatem probiotycznym a profilem zmian immunologicznych u jej potomstwa oraz u cieląt starszych z dodatkową podażą tego preparatu jeszcze w okresie posiarowym, nie w pełni jest jasna. Stan ten, po części wynikać może też z aktualnej sytuacji epizootycznej w danej populacji bydła, bieżącego stanu odporności tych zwierząt oraz lokalnych warunków ich chowu, a nawet z działań bioasekuracyjnych i prowadzonej równolegle immunoprofilaktyki swoistej. Pełna więc, wiarygodna ocena nastrocza zawsze duże trudności bowiem wielowątkowość oddziaływań mikroorganizmów probiotycznych zwłaszcza poprzez wpływ na naturalną mikrobiotę organizmu ogranicza wydanie swobodę działania i realną ocenę mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, a w konsekwencji również tworzenie zasad ich wykorzystania w praktyce jako np. naturalnej formy uzupełnienia immunoprofilaktyki nieswoistej. Dlatego też, przyjęta przez Doktoranta 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, a nawet stać się też punktem wyjścia do rozszerzenia podstaw tzw. skojarzonej terapii możliwej do zastosowania zarówno w leczeniu zakaźnych, jak i niezakaźnych chorób bydła. Należy też dodać, że wszelkie tego typu inicjatywy zmierzające do poszerzenia wiedzy w zakresie wykorzystania probiotyków w szeroko pojętej profilaktyce i leczeniu zakończone opracowaniem skutecznych, standardowych (np. co do dawki i sposobu oraz okresu podawania) modeli stosowania dodatków probiotycznych w zróżnicowanych grupach wiekowych bydła, które mogłyby być szybko zastosowane w warunkach terenowych, są niezwykle potrzebne. Otrzymane dotychczas wyniki zaprezentowane w dysertacji dają taką szansę ale wymagają one jeszcze szerszego potwierdzenia w praktyce hodowlanej.

Badania wykonane przez Doktoranta w sposób wnikliwy dokumentują omawiane już i obserwowane wcześniej u innych gatunków zwierząt, a także u człowieka proimmunologiczne właściwości probiotyków, mają one przy tym duży potencjał aplikacyjny oraz obrazują kierunki zmian ustrojowych składające się na całokształt interakcji na płaszczyźnie odpowiedź immunologiczna krów-matek oraz ich potomstwa, a także u cieląt starszych w późniejszym okresie podawania im dodatków probiotycznych. Badania te pozwoliły poznać złożoność tych zjawisk w kontekście szerszego wglądu w mechanizmy zwłaszcza komórkowej odpowiedzi immunologicznej, rozpatrywanej dotychczas dość wybiórczo, a tylko w kompleksowym podejściu do problemu, które przyjął Doktorant i konsekwentnie realizował w badaniach prowadzonych w warunkach terenowych, mógł uzyskać wiarygodne i przydatne dane. O właściwym ukierunkowaniu badań świadczą m.in. uzyskane wyniki, które pozwoliły Autorowi na sformułowanie aż 8 wniosków (przy czym 3 i 6-ty w kolejności mają raczej bardziej ogólny charakter mniej wyływający z ustalonych wcześniej celów badania), które przedstawione zostały w dostatecznie syntetycznej formie podsumowującej wszystko co udało się w pracy wykazać (pewnym istotnym przy tym mankamentem, unikany dotychczas w tego typu opracowaniach, jest brak numerowania kolejnych wniosków). 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 ustrzegł się Autor w trakcie przygotowywania dysertacji doktorskiej, w większości jednak natury stylistyczno-porządkowej (uwagi zamieszczono w tekście, np. niezbyt trawnie przyjęto termin na str. 22 „**kiszonka kukurydziana**” raczej należałoby użyć: kiszonka z kukurydzy, kolejny, niezbyt „strawny” językowo termin; „ocena ...**bójczości** komórek..” jeżeli już to raczej ocena zdolności bójczych czy może lepiej bakteriobójczych komórek fagocytykujących., kolejny termin str. 22: sztuczne zapłodnienie i przyjęty skrót anglojęzyczny **AI**, który bardziej kojarzy się z „*artificial intelligence*”, szczególnie w obecnej dobie, niż z „*artificial insemination*” z tego tytułu bardziej pożądanym byłyby używać wyłącznie polskiej terminologii itp.), niektóre tylko o bardziej merytorycznym charakterze, których korekta byłaby wskazana przed ostatecznym wysłaniem pracy do druku. Poniżej, niektóre z nich:

1. W metodyce dysertacji doktorskiej w opisie pobierania krwi od krów (str. 25) zapisano, prawdopodobnie błędnie, o 10 dniu przed porodem jako o jednym z kolejnych dni pobieraniu krwi od krów, kiedy całość omówienia w tekście i dane w dokumentacji graficznej dotyczą 14 dnia przed porodem. W tym miejscu należy też krytycznie wspomnieć o braku konsekwencji w użytych skrótach dla tego punktu czasowego pobierania krwi zastosowano bowiem liczne skróty: **DPRP** (str. 30, 32-ryc.: Komórki fagocytykujące - Phagotest, str. 42, a tak, na marginesie, trudno dociec co w rozwinięciu ten skrót DPRP a nawet DPRZ znaczy ?), kolejny użyty skrót **DPRZ** (str. 32-ryc: SIF neutrofilii - Phagotest, 33 i inne) i wreszcie anglojęzyczny **DBP** str. 38-ryc; zastanawiające jest też dlaczego ta rycina jako jedyna jest kolorowa ?). Wymaga to ujednolicenia i przyjęcia wyłącznie polskojęzycznych skrótów, a może nawet w celu pełnej unifikacji właściwym byłoby zastosować odpowiednie skróty do określenia punktów czasowych pobierania krwi również u cieląt.
2. W przypadku 3 i 6-go z zaprezentowanych w pracy doktorskiej wniosków (brak numerowania wniosków ?, sprawia to kłopoty i narzuca konieczność ich liczenia przy każdej kolejnej próbie ich analizy) rodzi się pewna wątpliwość o zasadność ich zamieszczenia, są one bowiem bardziej ogólnego i deklaracyjnego charakteru i nie do końca wiążą się z „meritum” pracy i jej zasadniczymi celami, a bardziej wypływają z wiedzy ogólnej (lub nawet tzw. popularnonaukowej) i

poglądów reprezentowanych w powszechnie dostępnych danych literaturowych. Tak więc, należy krytycznie rozważyć, czy ich zamieszczanie jest uzasadnione i czy są one wypadkową bezpośrednio wykonanych badań ?

3. W dołączonym do pracy piśmiennictwie źródłowym (*Literatura*) pewne pozycje (w sumie 5; tylko dwie z nich przytoczono w całości dla przykładu poniżej w recenzji, resztę zaznaczono cytując nazwiska autorów i pozycje w piśmiennictwie) **nie mają swoich bezpośrednich cytowań w tekście**, inne **różnią się datą wydania** (np. Kimura i in. 2006 - str.8 i 12 czy 1999 - str.11 i 63; PrabhuDas i in. 2016- str. 50 czy 2015 – str.67; Bachman i Schairer, 2002 – str. 5 czy 2003 – str.56), a jeszcze inne **występują w tekście pracy ale nie ma ich w wykazie** (np. Nowak i in., 2010 – str. 17 jest tylko pozycja z roku 2006 ?; Ingvarsen i Andersen, 2000 – str. 8), wymaga to więc stosownej weryfikacji.

- Enemark J., 2008. *The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA):a review. Vet. J. 176, 32-43.*

- Littledike E.T., Young J.W., Beitz D.C. 1981. *Common metabolic diseases of cattle: ketosis, milk fever, grass tetany, and downer cow complex. J. Dairy Sci. 64, 1465-1482.*

- Macmillan K., i in. 1996, poz. 94

- Reddy J.N.R. i in. 2000, poz. 142

-Reig M. Toldrá 2008, poz. 144

Ponadto, praca autorstwa : *Drackley J.K., Dann H.M., Douglas N., Guretzky N.A.J., Litherland N.B., Underwood J.P., Loo J.J. rok wydania 2005* (str. 59 poz. 38) **lub 2010** (str. 59 poz. 39) z tym samym tytułem i miejscem edycji: *Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. Ital. J. Anim. Sci. 4, 323-344.* jest prawdopodobnie zdublowana. Dodatkowo w tym przypadku w odniesieniu do nazwiska autora: **Drackley J.K.** konieczne jest wyjaśnienie i ewentualnie korekta jego pisowni bowiem w innej pozycji (37), a zdaje się, biorąc pod uwagę inicjały imion (J.K), że jest to ta sama osoba, której nazwisko (w poz. 37 i na stronach; 5, 6, 7 zapisano prawdopodobnie błędnie jako: **Dracley J.K.**

Wspomniane i zawarte w tekście uwagi nie mają jednak istotnego wpływu na ogólną dobrą 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 odporności komórkowej u bydła w różnych grupach wiekowych oraz okresach ich rozwoju i etapach produkcji w następstwie podawania im preparatów probiotycznych, a Pan lek. wet. Hubert Gorzkoś dobrze wywiązał się z postawionego sobie zadania. Doświadczenia zaplanował On prawidłowo i dokładnie je wykonał, przy użyciu powszechnie akceptowanych i aktualnych metod badawczych, gwarantujących wiarygodność uzyskiwanych wyników. W pracy zamieścił pełną dokumentację graficzną z przeprowadzonych badań, która ułatwia czytającemu weryfikację wyników badań. Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pana **lek. wet. Huberta Gorzkosia** pt. **„Wpływ podawania probiotyków u krów mlecznych w okresie zasuszenia, okołoporodowym i wczesnej laktacji oraz u ich potomstwa, na wybrane parametry komórkowej odpowiedzi immunologicznej”** 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 wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria UP w Lublinie o dopuszczenie Pana lek. wet. Huberta Gorzkosia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


prof. dr hab. Dariusz Bednarek