

RECENZJA

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 ”*

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

Recenzja została wykonana zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 27.04. 2023 r.

Prowadzona przez ostatnie dziesięciolecia intensywna selekcja genetyczna wraz z wprowadzeniem nowych systemów żywienia i utrzymania bydła doprowadziła do znacznego wzrostu wydajności krów mlecznych, szczególnie rasy H-F. Niestety, genetycznie uwarunkowane zwiększanie wydajności koreluje z częstszą zapadalnością zwierząt na choroby metaboliczne, niedoborowe czy też zaburzenia w rozrodzie. W nowoczesnej hodowli bydła (nakierunkowanej na uzyskanie jak największej wydajności mlecznej) obserwuje się coraz częściej tendencję do zmniejszania się częstotliwości występowania klinicznych przypadków chorobowych z jednoczesnym podwyższeniem pojawiania się stanów podklinicznych generujących duże straty produkcyjne. Do najczęściej występujących problemów zdrowotnych pojawiających się w formie podklinicznej u krów wysokoprodukcyjnych należą zaburzenia metaboliczne takie jak ketoza, syndrom stłuszczenia wątroby czy choroby niedoborowe. Newralgicznym okresem dla życia wysokowydajnej krowy (w którym te problemy zdrowotne ulegają nasileniu) jest okres przejściowy definiowany jako czas zawarty pomiędzy 3 tygodniami przed porodem do 3 tygodni po porodzie. W okresie tym u krów mlecznych dochodzi także do osłabienia odpowiedzi immunologicznej skutkującej większym narażeniem na procesy zapalne, szczególnie wymienia i macicy. Występująca immunosupresja związana jest głównie z wysokim poziomem mediatorów stresu takich jak noradrenalina, adrenalina czy glikokortykoidy

Dodatkowym czynnikiem obniżającym odporność w tym okresie jest pojawiający się bardzo często negatywny bilans energetyczny związany z wysoką produktywnością zwierząt po porodzie i przestawieniem organizmu wysokowydajnej krowy z procesów anabolicznych (dominujących przed porodem) na przemiany kataboliczne. Należy podkreślić, że częstość występowania podklinicznych form chorób przemiany materii wzrasta, mimo poprawiających się warunków hodowlanych, żywieniowych, stosowania lepszych metod postępowania profilaktycznego oraz coraz większej świadomości hodowców. Od lat prowadzone są różne badania mające na celu wprowadzenie nowych strategii poprawy odporności u krów mlecznych w okresie przejściowym. Jednym z bardziej skutecznych sposobów wydaje się być stosowanie bakterii probiotycznych (pojedynczo lub w mieszanych kulturach bakteryjnych), które mogą wpływać pozytywnie na równowagę mikrobioty zasiedlającej przewód pokarmowy. Warty podkreślenia jest fakt, że stosowanie probiotyków w dobie coraz częstszej antybiotykoodporności bakterii jest alternatywą dla powszechnej aplikacji antybiotyków u zwierząt produkcyjnych.

Recenzowana praca doktorska lek. wet. Huberta Gorzkosia wpisuje się w tę tematykę, gdyż głównym jej celem jest ocena wpływu probiotyków stosowanych w postaci dodatków do żywienia na wybrane wskaźniki odporności komórkowej u krów mlecznych, urodzonych przez nie cieląt oraz ocenę wpływu tych probiotyków na odporność komórkową po podaniu cielętom po porodzie.

Eksperyment będący podstawą do napisania rozprawy doktorskiej został wykonany w stadzie 60 mlecznych krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, które były w różnych okresach laktacji, a ich wydajność mleczna (przy standardowej 305-dniowej laktacji) wynosiła od 7,200 do 8,720 kg na krowę. Krowy utrzymywane były w systemie wolno wybiegowym, a żywienie opierało się na systemie TMR, który stanowił kompletną dawkę pokarmową, dostosowaną do okresu fizjologicznego krowy. Do badań wybrano 20 cielnych krów będących w końcowym okresie laktacji przed zasuszeniem. Kwalifikację zwierząt do doświadczenia oparto na badaniach wstępnych obejmujących ocenę ogólnego stanu zdrowia zwierząt, badanie kliniczne oraz ocenę standardowych parametrów hematologicznych. Kontrolę układu rozrodczego polegającą na badaniu rektalnym oraz badaniu ultrasonograficznym przeprowadzano regularnie co miesiąc. Doświadczenie zostało podzielone na dwa etapy. Pierwszy przeprowadzono u dorosłych krów, a drugi u cieląt pochodzących od wybranych do badań krów. Wytypowane zwierzęta zostały podzielone na dwie grupy (każda po 10 krów) – grupę doświadczalną otrzymującą probiotyk oraz grupę kontrolną bez takiej suplementacji. Krowom grupy doświadczalnej podawano codziennie

preparat probiotyczny zawierający w 1ml *Saccharomyces cerevisiae* 5 x 10³ CFU, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus plantarum* 5 x 10⁶ CFU oraz *Rhodopseudomonas palustris*. Preparat podawano w formie płynnej, jako dodatek do karmy, w dawce zalecanej przez producenta (200 ml preparatu na 1 krowę dziennie), przez okres od wytypowania krów przed zasuszeniem do 12 tygodnia po porodzie. Od wszystkich krów pobierano sześciokrotnie krew do badań (przed zasuszeniem, 10 dni przed porodem, 7 dni po porodzie, 21 dni po porodzie, 60 dni po porodzie oraz 90 dni po porodzie) w celu oceny aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów, oceny wewnątrzkomórkowej bójczości komórek fagocytujących oraz analizy cytometrycznej. Dodatkowo w surowicy oznaczano koncentrację białka ostrej fazy jakim jest surowiczy amyloid (SSA).

W drugim etapie doświadczenia badaniem objęto 20 cieląt pochodzących od krów z grupy doświadczalnej i kontrolnej. Cielęta zostały podzielone również na dwie grupy po 10 sztuk w każdej, gdzie grupę doświadczalną stanowiły cielęta pochodzące od krów grupy doświadczalnej, natomiast cielęta pochodzące od krów grupy kontrolnej również stanowiły grupę kontrolną. Cielęta z pierwszej grupy otrzymywały doustnie od 3 dnia życia ten sam preparat probiotyczny, który był stosowany u krów, w dawce 100 ml/sztukę w pierwszym miesiącu, a następnie 50 ml/sztukę do 120 dnia życia. Krew do badań od cieląt była pobierana czterokrotnie - w 48 godzin po urodzeniu oraz 21, 60 i 120 dniu życia. W krwi i surowicy cieląt wykonywano oznaczenia tych samych parametrów co u krów.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica (wersja 10.0) oraz jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA). Normalność rozkładu danych potwierdzono za pomocą nieparametrycznego testu Kołomogorowa-Smirnowa z poprawką Lilleforsa. Uzyskane wyniki porównano między grupami kontrolną i eksperymentalną w celu określenia istotności statystycznej za pomocą testu t-Studenta dla prawdopodobieństwa $p < 0,05$. Różnice statystyczne między wynikami dla materiału zebranego w różnym czasie w grupie obliczono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testów post-hoc Tukeya i Duncana dla prawdopodobieństwa $p < 0,01$. Wyniki przedstawiono w tabelach oraz w postaci ilustracji graficznych.

Recenzowana praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, zawiera 75 stron tekstu, w tym rozdziały takie jak: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki badań, dyskusja, wnioski, bogate piśmiennictwo (przedstawione na 16 stronach i liczące w sumie 186 pozycji) oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Dokumentacja graficzna wyników badań została przedstawiona w postaci 8 tabel i 3 wykresów zamieszczonych bezpośrednio w tekście, którego dotyczą, a nie w osobnym rozdziale na końcu dysertacji,

przed spisem piśmiennictwa zawierającego cytowane pozycje literaturowe, co pozwala na łatwe śledzenie wyników doświadczenia. Proporcje poszczególnych rozdziałów są prawidłowo zachowane, zastosowane podrozdziały zarówno w spisie treści jak i odpowiednio w każdym rozdziale ułatwiają poszukiwanie fragmentów tekstu interesujących czytającego.

Tytuł recenzowanej rozprawy doktorskiej jasno odzwierciedla cel zaplanowanych badań, który został właściwie zrealizowany. We wstępie, liczącym 15 stron, Doktorant omawia najistotniejsze aspekty związane z nowoczesnym żywieniem bydła mlecznego, wskazuje genezę problemów zdrowotnych pojawiających się w okresie przejściowym u krów mlecznych, przedstawia szczegółowo czynniki wpływające na inhibicję ich układu immunologicznego, omawia rolę siary oraz jej wpływ na parametry odporności biernej warunkujące zdrowie cieląt, a także omawia mechanizmy odporności występujące u nowonarodzonych cieląt. Dodatkowo we wstępie znalazł się akapit dotyczący stosowanych strategii działania poprawiających odporność bydła i wykorzystywania w tym celu preparatów probiotycznych. Doktorant słusznie zauważa, że monitorowanie zaburzeń zdrowotnych pojawiających się w okresie przejściowym u wysokowydajnej krowy jest jednym z podstawowych warunków uzyskania jej właściwej wydajności mlecznej, a stymulacja w tym okresie układu immunologicznego ma niezwykle istotne znaczenie w utrzymaniu odpowiedniej zdrowotności organizmu. Wstęp napisany jest starannie, jego charakter merytoryczny nie budzi żadnych zastrzeżeń, a styl pracy jest bardzo przejrzysty i klarowny dla czytającego. Sposób przekazywania treści zawartych w tym rozdziale świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktoranta, szerokiej znajomości aktualnego piśmiennictwa oraz właściwym doborze cytowanych pozycji. W dalszej części pracy Doktorant formułuje jasno sprecyzowany cel badawczy i następnie opisuje materiał i metody. Doświadczenie zostało przeprowadzone na właściwie dobranej liczbie krów i cieląt, harmonogram badań nie budzi zastrzeżeń, a użyte metody badań laboratoryjnych są wiarygodne, nowoczesne i adekwatne do stosowanych w innych badaniach tego typu opisywanych w literaturze.

W swojej pracy Doktorant skoncentrował się na ocenie wybranych wskaźników odpowiedzi immunologicznej u krów w okresie od ostatniego tygodnia poprzedniej laktacji, poprzez okres zasuszenia aż do szczytu kolejnej laktacji. Głównym założeniem przeprowadzonych badań było określenie wpływu stosowanego preparatu probiotycznego na funkcję układu immunologicznego krów mlecznych w różnych okresach laktacji. Kandydat wykazał, że już po 4 tygodniach stosowania probiotyku aktywność fagocytarna jak i bójcza komórek fagocytujących oraz średnia intensywność fluorescencji granulocytów i monocytów

uległy znacznemu podwyższeniu w grupie doświadczalnej i utrzymały się na wyższym poziomie w porównaniu do grupy kontrolnej do końca trwania doświadczenia. Ponadto w ocenianych subpopulacjach leukocytów u krów grupy doświadczalnej obserwowano wzrost odsetka limfocytów regulatorowych (Foxp3+) oraz aktywowanych limfocytów B (CD25+) z jednoczesnym obniżeniem się procentowej ilości nieaktywowanych limfocytów B (CD21+). Uzyskane wyniki wskazują na wzmożoną aktywność zarówno komórkowych jak i humoralnych mechanizmów immunologicznych w grupie krów otrzymujących probiotyk i mogą być efektem uruchomienia w ich organizmach procesów regulatorowych w układzie immunologicznym. Badania Doktoranta wykazały również, że działanie stymulujące układ immunologiczny preparatu probiotycznego rozpoczęło się już przed porodem i krowy z grupy doświadczalnej wykazywały szybszą zdolność do wyrównywania stanów osłabienia odporności występujących w okresie okołoporodowym. Interesujące wyniki zostały uzyskane także w odniesieniu do stężenia SSA. Wyższa koncentracja tego parametru w surowicy krów grypy kontrolnej (nie otrzymującej probiotyku) przez okres całego doświadczenia świadczy o ich większym narażeniu na stany zapalne i wskazuje na ciągłą wzmożoną aktywność komórek odpornościowych należących do nieswoistych mechanizmów immunologicznych, której efektem jest produkcja białek ostrej fazy. W drugim etapie doświadczenia Doktorant wykazał, że podawanie preparatu probiotycznego cielnym krowom ma istotny wpływ na wzrost aktywności komórek immunologicznych również u ich potomstwa, co może być związane z przyswajaniem przez cielęta leukocytów pochodzących z siary. Wyniki badań uzyskane u cieląt otrzymujących probiotyk wskazują także na stymulację układu immunologicznego, lecz regulacja odpowiedzi immunologicznej była inna, niż u krów. U cieląt, w porównaniu do ich matek, wykazano niską procentową zawartość limfocytów regulatorowych Foxp3+ oraz aktywowanych limfocytów B (CD25+), natomiast stwierdzono porównywalny odsetek pozostałych ocenianych leukocytów, co wskazuje na niedojrzałość wrodzonych, głównie komórkowych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej.

Opisane w recenzowanej pracy badania pozwoliły Kandydatowi na wyciągnięcie ośmiu wniosków podsumowujących otrzymane wyniki. Wnioski stanowią odpowiedź na postawiony cel badawczy, natomiast całokształt wykonanych badań wnosi dużo do poszerzenia wiedzy o procesach odpornościowych u krów mlecznych i cieląt oraz ich modulowaniu za pomocą preparatów probiotycznych. Przedstawioną przez Doktoranta pracę oceniam wysoko, podjęty temat jest niezwykle istotny, uzyskane wyniki za pomocą nowoczesnych metod laboratoryjnych są jak najbardziej wiarygodne i mają nie tylko aspekt naukowy, ale także praktyczny. Doktorant wykazał przydatność i skuteczność stosowania

probiotyków u krów w całym okresie laktacji oraz u cieląt do 120 dnia życia, a uzyskana w ten sposób aktywacja układu immunologicznego może być dobrym źródłem ochrony przed zagrażającymi procesami chorobowymi tła zapalnego.

Z obowiązku Recenzenta należy jednak zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia, których nie ustrzegł się Autor w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej, w większości natury stylistyczno-edytorskiej (uwagi zamieszczono w tekście), których korekta pozwoli na bardziej przejrzystą formę w trakcie ostatecznej publikacji do druku. Poniżej, niektóre z nich:

- w rozdziale „materiał i metody” Doktorant nie podał wieku krów użytych w doświadczeniu. Istotnym faktem mogącym mieć wpływ na uzyskane wyniki jest wyrównanie wiekowe badanej stawki zwierząt.
- w tym samym rozdziale brakuje danych dotyczących ilości podanej cielętom siary i sposobu jej podania; czy był to odpój indywidualny – jeśli tak to jaki (wiadro ze smoczkiem czy sonda przełykowa), czy też cielęta odpajały się same.
- na stronie 25 w rozdziale „materiał i metody” zamieszczono tabelę z wynikami parametrów hematologicznych krów. Wydaje się, że tabela ta powinna się znaleźć w rozdziale „wyniki” wraz z krótkim opisem
- w moim odczuciu wniosek piąty i szósty powinien być połączony, gdyż obydwa odnoszą się do korzystnego wpływu podawanego probiotyku na status immunologiczny krów
- cennym uzupełnieniem wykonanych badań byłaby ocena jakości siary krów z obydwu grup, przede wszystkim określenie koncentracji w niej immunoglobulin klasy G, a także ich oznaczenie w surowicy cieląt w 48 godzinie życia. Pozwoliłoby to na określenie ewentualnego wpływu przedporodowej aplikacji stosowanego probiotyku na stymulację przekazywanej cielętom odporności biernej.
- w tekście pracy popełniono wiele pomyłek interpunkcyjnych np.; strona 11, wiersz 7 i 8 jest „ proces produkcji mleka a szczególnie przenikanie wymienionych składników....”, powinno być „proces produkcji mleka, a szczególnie przenikanie wymienionych składników....” , ta sama strona wiersz 30 jest „ wapń, dlatego, że najintensywniejszy...”, powinno być „wapń, dlatego że najintensywniejszy ...” .

Wspomniane uwagi mają głównie charakter porządkowy i w żadnym stopniu nie wpływają na bardzo dobrą ogólną ocenę recenzowanej pracy doktorskiej.

Reasumując ocenę całokształtu dysertacji należy podkreślić trafność wyboru tematu, aplikacyjność, prawidłowe przygotowanie i przeprowadzenie oraz szereg wykonanych badań w trudnych warunkach eksperymentu na krowach mlecznych i cielętach. Wymagało to dużego wysiłku ze strony Doktoranta, co zaowocowało przejrzystością opracowanych wyników i prawidłowo wyciągniętymi wnioskami, mającymi duże znaczenia poznawcze i praktyczne. Uzyskane wyniki badań zostały umiejętnie skonfrontowane ze współczesnym piśmiennictwem dotyczącym tematyki badań. Całość sprawia pozytywne wrażenie dobrze zaplanowanej i przemyślanej procedury badawczej, świadczy o opanowaniu warsztatu i solidności w badaniach.

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”* spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim oraz w pełni odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20.07.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1668 z późn. zm.).

W związku z powyższym przedstawiam Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pana lek. wet. Huberta Gorzkosia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Przemysław Sobiech

