

Prof. Jan Twardoń

Wrocław, 05 lipca, 2023 r

Uniwersytet Przyrodniczy

we Wrocławiu

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt

Gospodarskich

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”.

Recenzja została wykonana zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 27 kwietnia 2023 roku.

Oceniana praca na stopień doktora w dziedzinie i dyscyplinie Weterynaria została wykonana w Katedrze i Klinice Rozrodu Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Promotorem pracy jest dr hab. Piotr Brodzki, prof. uczelni.

W ostatnich latach bardzo dużym wyzwaniem dla medycyny ludzkiej oraz weterynarii , stała się narastająca oporność mikroorganizmów na antybiotyki. Problem przestał być wyłącznie przedmiotem zainteresowania naukowców, zyskał wymiar globalny i wymaga pilnych interwencji podnoszących świadomość kadry zarządzającej i opinii publicznej odnośnie konsekwencji niekontrolowanego stosowania leków przeciwbakteryjnych. Zagadnienia te ze względu na globalny zakres uznane zostały za priorytetowe w obszarze zdrowia publicznego przez szereg organizacji i agencji na całym świecie. W maju 2015 roku na Światowym Zgromadzeniu Zdrowia (najwyższy organ decyzyjny Światowej Organizacji Zdrowia – WHO), 194 państwa jednomyślnie stwierdziły, że problem antybiotykoodporności wielu drobnoustrojów staje się coraz bardziej istotny. I trzeba mu się przeciwdziałać globalnie. Niewłaściwe stosownie i nadużywanie preparatów przeciwbakteryjnych w różnych obszarach medycyny, medycyny weterynaryjnej, hodowli i rolnictwie przyczyniło się do pojawienia i

rozprzestrzeniania na szeroką skalę opornych drobnoustrojów dysponujących coraz sprawniejszymi mechanizmami lekooporności. Wiele szczepów opornych na antybiotyki, powstających na fermach, przenosi się wraz z żywnością i produktami pochodzenia zwierzęcego do środowiska ludzkiego. Prowadzi to do powstania „foodborne diseases”. Niektóre z tych chorób, powodowanych m.in. przez *Staphylococcus aureus* czy *Pseudomonas* okazują się nieuleczalne. Stąd tak ważnym wyzwaniem XXI wieku jest ograniczenia AMR (ang. Antimicrobial resistance).

Biorąc pod uwagę wymienione czynniki, stwierdzam, że doktorant dokonał słusznego wyboru obszaru badań i tematu pracy doktorskiej. To bardzo aktualny zakres badań, zmieniający się wraz ze wzrostem wydajności mlecznej, zmieniającymi się warunkami dobrostanu, jakości i metod żywienia, stosowania antybiotyków w terapii i profilaktyce chorób omawianych zwierząt. Wpisuje się tym samym w aktualne wyzwania nurtujące społeczeństwo, medycynę, hodowlę, ochronę zdrowia publicznego.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 75 stron maszynopisu, posiada klasyczny układ tego typu opracowań z następującymi rozdziałami: wstęp, cel badań, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, literatura, streszczenie. Materiał do badań oraz wyniki badań zestawiono w dokumentacji na którą składa się 8 tabel oraz 3 ryciny. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Piśmiennictwo obejmuje 186 pozycji.

Celem badań w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej było poznanie wpływu i sposobu działania probiotyków na układ immunologiczny dorosłych krów i ich cieląt. Cel ten realizowano przez wykonanie następujących zadań:

- ocenę wpływu probiotyków stosowanych w postaci dodatków do żywienia, na wybrane wskaźniki odporności komórkowej u krów mlecznych,
- określenie czy stosowanie probiotyków w żywieniu krów mlecznych ma uzasadnienie w różnych okresach laktacji, czy wystarczy ich stosowanie w ograniczonym czasie, np. w okresie przejściowym,
- ocenę wpływu probiotyków stosowanych u ciężarnych krów przez 6 ostatnich tygodni ciąży (cały okres zasuszenia), na wybrane parametry odporności komórkowej u urodzonych przez nie cieląt,
- ocenę wpływu probiotyków podawanych cielętom od 3 do 120 dnia po ich urodzeniu, na wybrane wskaźniki odporności komórkowej u tych cieląt.

Badania zostały przeprowadzone na stadzie liczącym 60 krów mlecznych rasy holsztyńsko-fryzyskiej w różnych okresach laktacji. Badaniami objęto również 20 cieląt pochodzących od krów wyznaczonych do doświadczenia. Właściwe doświadczenia przeprowadzono w dwóch etapach. W pierwszym etapie poddano badaniom 20 ciężarnych krów przed ich wejściem w okres zasuszenia. Drugi etap badań dotyczył 20 cieląt pochodzących od wymienionych wyżej matek. Zwierzęta podzielono na grupę doświadczalną i kontrolną, w każdej po 10 sztuk. W grupie doświadczalnej krów i cieląt stosowano preparat probiotyczny – EM-Probiotyk, Greenland Technology EM, Trzcianki Poland. Produkt zawierał w swoim składzie w 1 ml *Saccharomyces cerevisiae* 5×10^3 CFU, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus plantarum* 5×10^6 CFU oraz *Rhodopseudomonas palustris* i melasę trzcinową. Krowy otrzymywały dziennie po 200 ml preparatu w formie płynnej jako dodatek do paszy. Cielęta natomiast bezpośrednio po porodzie były odpajane siarą, a następnie przez kolejne 5 dni były karmione mlekiem matki. Po tym terminie stosowano karmienie preparatem mleko zastępczym przez 8 tygodni. Cielęta grupy doświadczalnej otrzymywały od 3 dnia życia preparat probiotyczny EM – Probiotyk w okresie do 120 dnia życia.

Materiał do właściwych badań biochemicznych stanowiła krew obwodowa, pochodząca od krów i cieląt. Krew od krów pozyskiwano sześciokrotnie. Pierwszy raz przed zasuszeniem a następnie w 10 dniu przed porodem. Po porodzie krew pobierano w następujących terminach: w 7, 21, 60 oraz 90 dniu.

U cieląt krew do badań pobierano w 48 godzinie oraz w 21, 60 i 120 dniu po urodzeniu.

W celu osiągnięcia zamierzonego celu badawczego, stosowano metody badawcze oceniające aktywność fagocytarną granulocytów i monocytów, wewnątrz komórkową bójczość komórek fagocytujących, dokonano analizy cytometrycznej neutrofilii, przeprowadzono fenotypowanie leukocytów metodą cytometrii przepływowej, wykonano pomiary surowiczego amyloidu A w surowicy krwi. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej.

Analizując układ doświadczenia pod względem doboru zwierząt oraz zastosowanych metod badawczych, należy stwierdzić, że doświadczenia zostały przeprowadzone na stawce krów i cieląt właściwie dobrane pod względem ilości, jakości, właściwego okresu życia oraz okresu reprodukcji. Harmonogram wykonywanych doświadczeń w aspekcie doboru materiału, pobierania prób i ich oceny był właściwy w odniesieniu 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, doktorant sformułował 8 wniosków, w tym 6 dotyczących badań przeprowadzonych na krowach i dwa na ich cielętach. Autor w przedstawionych pierwszych sześciu wnioskach stwierdza, że przeprowadzone badania na krowach wykazały wzrost aktywności fagocytarnej i wewnątrzkomórkowej bójczości komórek fagocytujących w ich krwi obwodowej. Wykazano również wzrost procentowy udziału i aktywności wybranych limfocytów. Zmiany te – według autora pracy – są wynikiem uruchomienia procesów regulatorowych w układzie immunologicznym – zarówno komórkowym jak i humoralnym u krów otrzymujących probiotyk poprzez aktywację odpowiednich mechanizmów niezbędnych do likwidacji ewentualnego zagrożenia jak i jednoczesnej stabilizacji układu immunologicznego. Potwierdzeniem aktywnego zachowania się układu immunologicznego u krów otrzymujących probiotyk, było utrzymywanie się stałego, niskiego poziomu surowiczego amyloidu A (SAA) przez cały czas trwania doświadczenia. Na podstawie uzyskanych istotnie wyższych wartości immunologicznych u krów w grupie doświadczalnej w porównaniu do krów kontrolnych w przebiegu całego doświadczenia autor stwierdza, że zastosowanie probiotyków jako dodatków żywieniowych u krów, ma uzasadnienie w różnych okresach laktacji i reprodukcji.

Podobne, korzystne wartości układu immunologicznego autor wykazał w grupie badanych cieląt, co zostało podkreślone we wniosku 7 i 8.

Należy pokreślić aktualność problematyki badań związanych z ograniczaniem stosowania antybiotyków w terapii i profilaktyce chorób bydła. Rozprawa doktorska opracowana jest w sposób zwarty i uporządkowany. Jej treść świadczy o tym, że doktorant dysponuje odpowiednim zasobem wiedzy i ma opanowany warsztat badawczy w omawianej tematyce.

Generalnie pozytywnie oceniam przedstawioną do recenzji pracę doktorską. Jednak, po szczegółowej analizie celu, wyników badań i przedstawionych wniosków, nasuwa się spostrzeżenie o ogólnych stwierdzeniach i przypuszczeniach. Nie udało się zrealizować jednego z celów badań jakim był poznanie sposobu działania probiotyku. Autor dysertacji w dyskusji stwierdza: (Na podstawie badań własnych, nie można jednoznacznie wykazać mechanizmu stymulującego aktywność fagocytarną i biobójczą komórek immunokompetentnych oraz zmiany zachodzące w procentowym udziale

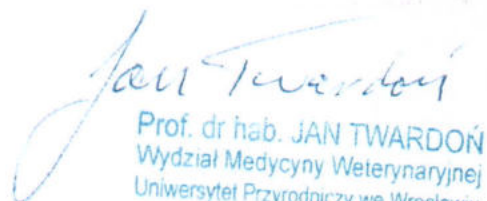
poszczególnych subpopulacji leukocytów w organizmie krów doświadczalnych). Potwierdzeniem obiecujących wyników badań laboratoryjnych stosowania probiotyków jako dodatek do paszy u krów i ich cieląt mogłoby być ich stosowanie w gospodarstwach w których występują problemy zdrowotne u omawianych zwierząt.

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 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” 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 autora do prowadzenia pracy badawczej.

Uważam, że rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z póź. zm.)

Przedkładam zatem wniosek Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie pracy i dopuszczenie lekarza weterynarii Huberta Gorzkosia 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