

prof. dr hab. Agata Banczerz-Kisiel

Katedra Epizootiologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Artura Ciszewskiego** pt. „**Wpływ podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM Provet) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt broilerów**”, wykonanej pod kierunkiem promotora – dr hab. Łukasza Sebastiana Jarosza, profesora UP w Lublinie, w Katedrze Epizootiologii i Klinice Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Podstawa formalna

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi uchwała nr RD Wet 2/2026 Rady Dyscypliny Naukowej Weterynaria, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, z dnia 5 lutego 2026 roku.

Oryginalność, aktualność i przydatność podjętego problemu naukowego

Doktorant podjął się badań nad wpływem podawania *in ovo* wieloszczepowego probiotyku zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM) i chelatu glicynowego cynku (Zn-Gly) na stan zdrowia, potencjał odporności i wskaźniki produkcyjne kurcząt brojlerów. Współczesna produkcja drobiarska, nieustannie dążąca do uzyskiwania wysokiej wydajności chowu przy jednoczesnym zapewnieniu jak najwyższej zdrowotności stada i ograniczeniu stosowaniu antybiotyków, wymaga ciągłego poszukiwania nowych rozwiązań. Obniżenie odporności ptaków, większa zachorowalność i śmiertelnością piskląt oraz rozwój lekooporności drobnoustrojów, towarzyszące hodowli wielkostadnej, skłaniają do opracowywania

alternatywnych metod profilaktyki i stymulacji wzrostu, spośród których na uwagę zasługuje suplementacja dodatków bioaktywnych metodą *in ovo*. Wykazano bowiem, że dostarczanie tych związków na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego wpływa na zwiększenie przeżywalności piskląt, przyspiesza ich rozwój i wzmacnia odporność, ograniczając konieczność stosowania antybiotyków w odchowie. Podjęte badania uważam zatem za ważne i w pełni uzasadnione.

Ocena formalna

Przedmiotem rozprawy doktorskiej **lek. wet. Artura Ciszewskiego** jest opracowanie naukowe, opublikowane w cyklu 5 jednotematycznych artykułów naukowych:

- 1) **Ciszewski, A.**, Jarosz, Ł., Marek, A., Michalak, K., Grądzi, Z., Kaczmarek, B., Rysiak, A.: Effect of combined *in ovo* administration of zinc glycine chelate (Zn-Gly) and a multistrain probiotic on the modulation of cellular and humoral immune responses in broiler chickens. *Poultry Science* 2023, 102(9), 102823. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.10282> (**Punkty MNiSW2023 140, IF2023 = 3.8**)
- 2) **Ciszewski, A.**, Jarosz, Ł.S., Bielecka, A., Marek, A., Szymczak, B., Grądzi, Z., Rysiak, A.: Effect of *in ovo* administration of a multi-strain probiotic and zinc glycine chelate on antioxidant capacity and selected immune parameters in newly hatched chicks. *Antioxidants (Basel)* 2023, 12(11), 1905. <https://doi.org/10.3390/antiox12111905> (**Punkty MEN2023 140, IF2023 = 6.0**)
- 3) **Ciszewski, A.**, Jarosz, Ł.S., Michalak, K., Marek, A., Grądzi, Z., Wawrzykowski, J., Szymczak, B., Rysiak, A.: Proteome and peptidome changes and Zn concentration in chicken after *in ovo* stimulation with a multi-strain probiotic and Zn-Gly chelate: preliminary research. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(2), 1259-1280. <https://doi.org/10.3390/cimb46020080> (**Punkty MEN2024 70, IF2024 = 3.0**)
- 4) **Ciszewski, A.**, Jarosz, Ł., Grądzi, Z., Marek, A., Kaczmarek, S., Kwiecień, M., Rysiak, A.: Effect of *in ovo* feeding with a multi-strain probiotic containing effective microorganisms and Zn-Gly chelate on the fatty acid profile, lipid profile, and malondialdehyde level in the serum and tissues of newly-hatched chickens. *Livestock Science* 2024, 289, 105577. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105577> (**Punkty MEN2024 140, IF2024 = 1.9**)
- 5) **Ciszewski, A.**, Jarosz, Ł.S., Grądzi, Z., Marek, A., Kaczmarek, B., Hejdysz, M., Rysiak, A.: Influence of a multi-strain probiotic and zinc-glycine chelate, administered *in ovo*, on immune response in newly hatched chicks. *Frontiers in Physiology* 2025, 16, 1646143. <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1646143> (**Punkty MEN2025 100, IF2025 = 3.4**)

Sumaryczny IF prac wynosi **18.10**, a punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego – **590** punktów. Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich 5 wieloautorskich publikacjach. Do prac dołączone zostały oświadczenia współautorów, z których wynika, że udział lek. wet. Artura Ciszewskiego w powstaniu poszczególnych artykułów był znaczący (80%), a rola wiodąca. Z obowiązku recenzenta zmuszona jestem wskazać na jedną rozbieżność między deklarowaną przez Doktoranta rolą w powstaniu pracy 4 – współudział w opracowaniu metodyki badań, a brakiem tej informacji w wykazie ról współautorów w opublikowanym artykule. Mniemam, że wynika to z niedopatrzenia.

Zgodnie z oświadczeniem Autora rozprawy doktorskiej wszystkie procedury badawcze wykorzystywane w doświadczeniu zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (nr zgody 106/2022 z dnia 17 października 2022 r.), a w trakcie realizacji doświadczenia przestrzegano zasad dobrostanu zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych do celów naukowych, zgodnie z Ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych oraz dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Badania zostały przeprowadzone dzięki wsparciu finansowemu Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Ocena merytoryczna

We Wstępie przedłożonego opracowania, Doktorant zaznajamia czytelnika ze specyfiką problemu badawczego. Omawia wyzwania współczesnej produkcji drobiarskiej, aspekt zdrowotności ptaków w okresie zarodkowym i powylęgowym, technologię *in ovo* jako narzędzie wczesnej immunomodulacji, rolę cynku i probiotyków jako bioaktywnych czynników immunostymulujących u drobiu, możliwości stosowania probiotyków wieloszczepowych opartych na efektywnych mikroorganizmach (EM) w produkcji drobiarskiej oraz rolę chelatu glicynowego cynku (Zn-Gly) jako immunomodulatora i czynnika wspierającego rozwój zarodków. W mojej ocenie ta analiza zgromadzonego piśmiennictwa, poświęconego omawianym zagadnieniom, jest dobrym wprowadzeniem do uzasadnienia celowości przeprowadzonych badań. Część ta, podobnie zresztą jak całość opracowania, napisana jest naukowym, merytorycznym językiem, bez błędów stylistycznych, składniowych, czy interpunkcyjnych, co zasługuje na uznanie. Moje jedyne zastrzeżenia do tej części dotyczą wyrażenia „pożyteczne” bakterie, które w kontekście tak zaawansowanej

naukowo pracy jest zbędnym kolokwializmem oraz braku opisu działania *Saccharomyces cerevisiae*, podczas gdy opisy pozytywnego wpływu na organizm dwóch pozostałych probiotyków z preparatu EM Provet we Wstępie się znalazły.

Następnie Doktorant przedstawia założenia i cele swoich badań, podchodząc do nich w nieco odmienny niż zwykle sposób, albowiem wyznacza dwa cele – poznawczy i aplikacyjny, a szczegółowe cele badawcze prezentuje jako hipotezy, poddawane weryfikacji w toku badań. Następny rozdział – Materiały i metody oraz kolejne – Omówienie wyników badań i Dyskusja podzielone są na podrozdziały dotyczące wyżej wymienionych aspektów w odniesieniu do opublikowanych artykułów naukowych. W moim odczuciu czytelniej byłoby po prostu opisać poszczególne publikacje, ale rozumiem czemu Doktorant przygotował opracowanie w taki właśnie sposób – przeprowadził jedno, duże doświadczenie kliniczne, które umożliwiło publikację uzyskanych wyników w 5 artykułach naukowych, poświęconych różnym zagadnieniom.

W rozdziale Materiał i metody lek. wet. Artur Ciszewski opisuje eksperyment, w którym wykorzystano łącznie 1400 zapłodnionych jaj kurcząt brojlerów Ross 308, podzielonych na cztery grupy – kontrolną; z probiotykiem zawierającym EM; z probiotykiem zawierającym EM i Zn-Gly oraz wyłącznie z Zn-Gly. Jaja inkubowano do wyklucia, po którym pisklęta ze wszystkich grup poddawano seksowaniu, a następnie wybierano losowo do dalszych etapów badań po 150 jednodniowych kurcząt płci żeńskiej z każdej grupy. W przypadku doświadczeń na brojlerach seksowanie nie jest konieczne, stąd moje pytanie do Doktoranta co było przyczyną tego działania i dlaczego wybrano kurczęta płci żeńskiej. W rozdziale tym brakowało mi także nieco bardziej szczegółowego opisu metodyki do analizy ekspresji mRNA immunoglobulin w jelicie biodrowym, choć w artykule podejmującym ten temat (praca 5) jest to zagadnienie opisane w sposób prawidłowy. W rozdziale Omówienie wyników badań Doktorant prezentuje ogromną ilość danych, pozyskanych w trakcie doświadczenia, czyniąc to w sposób zarówno precyzyjny, jak i zrozumiały. Na uwagę zasługuje także rozdział Dyskusja, w którym lek. wet. Artur Ciszewski w sposób dojrzały omawia uzyskane wyniki i analizuje je w odniesieniu do dostępnych pozycji literaturowych, opisujących rezultaty badań innych autorów. Wyniki badań własnych lek. wet. Artur Ciszewski opublikował w jednotematycznym cyklu 5 oryginalnych prac naukowych, przygotowanych w sposób charakterystyczny dla tego rodzaju opracowań.

Celem badań opisanych w pierwszej pracy było określenie wpływu skojarzonego podawania *in ovo* chelatu Zn-Gly i probiotyku wieloszczepowego na wybrane wskaźniki komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej kurcząt, poprzez ocenę immunofenotypu jednojądrzastych komórek krwi obwodowej i śledziony. Co ciekawe, zarówno skojarzone, jak i pojedyncze podanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu cynkowo-glicynowego znacząco zmniejszyło wylęgowość piskląt. Natomiast zastosowanie cytometrii przepływowej umożliwiło wykazanie najwyższego odsetka komórek T CD4+, CD4+CD25+ i wysokiej ekspresji KUL01 w surowicy zwierząt z grupy suplementowanej probiotykiem i Zn-Gly zarówno 12 h, jak i 7 dni po wykluciu. U ptaków suplementowanych probiotykiem i chelatem cynku stwierdzono także wysoki odsetek komórek TCR $\gamma\delta$ + w surowicy i śledzionie 12 h po wykluciu oraz w surowicy po 7 d. Odsetek limfocytów Bu-1A+ w surowicy i śledzionie 12 h i 7 d po wykluciu również był najwyższy w grupie suplementowanej probiotykiem i Zn-Gly, podczas gdy najwyższą ekspresję CD79A zaobserwowano z kolei w grupie suplementowanej jedynie chelatem cynku. Uzyskane przez Doktoranta wyniki potwierdziły silny wpływ skojarzonego podawania probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly na proliferację limfocytów i stymulację komórkowych mechanizmów odpornościowych u ptaków.

Celem badań zaprezentowanych w drugiej pracy było określenie wpływu skojarzonego stosowania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy i chelatu Zn-Gly na kształtowanie się całkowitej zdolności antyoksydacyjnej, stężenie grup sulfhydrylowych, mostków bityrozynowych, formylokinureny, wodoronadtlenków i białka w surowicy, wątrobie, jelicie cienkim, sercu i mięśniach piersiowych kurcząt brojlerów w 12 godzinie po wykluciu i w 7 dniu życia oraz w woreczku żółtkowym w 12 godzinie po wykluciu. Analogicznie, w tych samych terminach oznaczano stężenie katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, kortykosteronu, cytokin pro- i przeciwzapalnych, TNF- α , IFN- β , Il-6, Il-10 i białka szoku cieplnego 70 w surowicy, wątrobie, jelicie cienkim i grubym i w woreczku żółtkowym kurcząt. Uzyskane przez Doktoranta wyniki wskazały na wysoką aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w jelicie cienkim i grubym piskląt 12 godzin po wykluciu, w grupach otrzymujących probiotyk wieloszczepowy oraz w jelicie cienkim i woreczku żółtkowym ptaków otrzymujących probiotyk wieloszczepowy i chelat Zn-Gly. Wysokie stężenia TNF- α i IFN- γ w woreczku żółtkowym i surowicy po podaniu *in ovo* chelatu Zn-Gly obserwowano 12 godzin po wykluciu. Zastosowanie probiotyku i probiotyku z chelatem Zn-Gly zwiększyło zatem całkowitą pojemność antyoksydacyjną w tkankach kurcząt – co pozwala

przypuszczać, że podanie *in ovo* takiej kombinacji może utrzymać równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną u kurcząt i zwiększyć zdolność obronną przed stresem oksydacyjnym.

Celem badań opisanych w trzeciej pracy było określenie stężenia cynku w surowicy i tkankach kurcząt, którym podawano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i/lub chelat Zn-Gly oraz związanych z tą suplementacją różnic w proteomie i peptydomie narządów rozwijającego się organizmu. Wykazano, że suplementacja *in ovo* chelatem cynkowo-glicynowym zwiększyła stężenie Zn w surowicy i woreczku żółtkowym po 12 godzinach od wyklucia. Wyniki elektroforezy SDS-PAGE i western blot potwierdziły obecność dysmutazy ponadtlenkowej Cu/Zn w wątrobie oraz jelicie cienkim i grubym po 12 godzinach i po 7 dniach od wyklucia we wszystkich grupach. Analiza widm MALDI-TOF MS tkanek kurcząt wykazała natomiast we wszystkich grupach eksperymentalnych ekspresję białek i peptydów regulujących odpowiedź immunologiczną, procesy metaboliczne, wzrost, rozwój i reprodukcję.

Celem badań przedstawionych w pracy czwartej była ocena profilu lipidowego, profilu kwasów tłuszczowych oraz stężenia dialdehydu malonowego w surowicy i tkankach kurcząt, którym suplementowano *in ovo* probiotyk wieloszczepowy i/lub chelat Zn-Gly. Wyniki wykazały, że suplementacja *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym i chelatem Zn-Gly w 17. dniu inkubacji wpływa na metabolizm tłuszczów. Jednoczesne podanie probiotyku wieloszczepowego i chelatu nie zwiększyło stężenia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w mięśniach, ale zastymulowało syntezę nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA), głównie kwasu stearynowego, palmitynowego i mirystynowego, poprawiając tym samym stosunek PUFA do SFA. Wieloszczepowy probiotyk i chelat Zn-Gly podawane *in ovo* nie powodowały nadmiernej syntezy MDA w tkankach, co zdaniem Doktoranta sugeruje, że preparaty te zmniejszają stres oksydacyjny u rozwijającego się zarodka i nowo wyklutego pisklęcia.

Celem badań zaprezentowanych w pracy piątej było określenie wpływu skojarzonej suplementacji *in ovo* probiotykiem wieloszczepowym zawierającym EM i chelatem Zn-Gly na stężenie cytokin pro- i przeciwzapalnych Il-1 β , Il-2, Il-6, Il-8, Il-12, Il-10, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , białek ostrej fazy, ceruloplazminy, α -1-kwaśnej glikoproteiny, haptoglobiny, surowiczego amyloidu A, lektyny wiążącej mannozę oraz immunoglobulin IgY, IgA, IgM we krwi obwodowej i tkankach kurcząt brojlerów w dniu wylęgu i w 7 dniu życia. Jednocześnie, w tych samych terminach określano masę narządów limfatycznych, będących wskaźnikami rozplemu komórek immunokompetentnych. Dokonano także oceny wpływu badanych preparatów na parametry produkcyjne kurcząt w całym okresie odchowu. Wyniki wskazały na wzmożoną

syntezę białek ostrej fazy w wątrobie, wzrost stężenia surowiczego amyloidu A w jelicie cienkim, wzrost poziomu mRNA IgA i IgM oraz zahamowanie syntezy cytokin prozapalnych IFN- γ i TNF- α . Zdaniem Doktoranta można wnioskować, że łączne stosowanie *in ovo* probiotyku wieloszczepowego i chelatu Zn-Gly moduluje odpowiedź immunologiczną w badanym zakresie, pomaga utrzymać równowagę między syntezą cytokin Th1 i Th2, hamuje procesy zapalne i stymuluje rozwój układu odpornościowego.

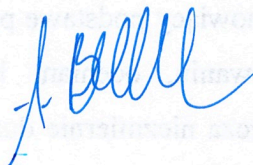
Cykl artykułów, stanowiący podstawę pracy doktorskiej i scharakteryzowany szczegółowo w załączonym opracowaniu, oceniam bardzo pozytywnie – jest spójny tematycznie i koncepcyjnie, dostarcza niezmiernie dużej ilości nowych danych, a prezentowane wyniki są ważne, przede wszystkim w aspekcie naukowym, ale także w klinicznym i aplikacyjnym. Należy podkreślić, że wszystkie prace opublikowano w uznanych czasopismach naukowych, o wysokim współczynniku wpływu. Podsumowanie uzyskanych wyników umożliwiło Doktorantowi wysnucie 12 wniosków, słusznych i uzasadnionych, momentami krytycznych, ale dobrze odzwierciedlających rezultaty przeprowadzonych badań. Opracowanie kończą dwa streszczenia – w języku polskim i angielskim oraz bogaty wykaz piśmiennictwa, liczący 425 pozycji. Załączone są również publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej oraz stosowne oświadczenia współautorów.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji praca stoi na bardzo dobrym poziomie naukowym. Zastosowana metodyka odpowiada standardowym warunkom prowadzenia badań, a na uznanie zasługuje nie tylko ich zakres, ale także eksperymentalny i innowacyjny charakter. Doktorant wykazał dobre opanowanie różnych technik stosowanych do oceny wskaźników humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej, sprawność w prowadzeniu doświadczenia klinicznego oraz biegłość w interpretacji wyników, które stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny weterynaria.

Stwierdzam, że praca doktorska **lek. wet. Artura Ciszewskiego** pt. „**Wpływ podawania *in ovo* probiotyku wieloszczepowego zawierającego efektywne mikroorganizmy (EM Provet) oraz chelatu Zn-Gly na parametry zdrowotne i produkcyjne oraz wskaźniki humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej u kurcząt broilerów**”, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskimi i odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r., poz.

1571 ze zm.). **Przedkładam zatem Radzie Dyscypliny Naukowej Weterynaria, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, wniosek o dopuszczenie lek. wet. Artura Ciszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a z racji wysokiej wartości poznawczej oraz aplikacyjnej badań zaprezentowanych w rozprawie, wnioskuję o jej wyróżnienie.**



prof. dr hab. Agata Banczerz-Kisiel