Jastrzębiec 2022-01-17

dr hab. Tomasz Sakowski prof. IGBZ
Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu
05-552 Magdalenka

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Kalińskiej - Łukasiewicz pt. **„Wykorzystanie nanocząstek srebra i miedzi w zwalczaniu patogenów wywołujących *mastitis* u krów mlecznych"** wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marcina Gołębiewskiego prof. SGGW

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Aleksandry Kalińskiej - Łukasiewicz podejmuje się rozwiązania niezmiernie istotnego, z punktu widzenia hodowcy, problemu leczenia zapalenia wymienia wywołanego przez patogeny obecne w środowisku produkcyjnym stada krów mlecznych. Prowadzona od niemal 50 lat jednostronna selekcja bydła w kierunku zwiększenia wydajności mlecznej krów doprowadziła między innymi do pogorszenia się cech zdrowotnych bydła mlecznego. *Mastitis*, czyli zapalenie gruczołu mlekowego, jest najpopularniejszą jednostką chorobową diagnozowaną u bydła mlecznego. Nadmierne wykorzystanie antybiotyków w terapii *mastitis,* przyczyniło się do powstania szczepów opornych na leczenie. Jest to obecnie na tyle palący problem, że antybiotykoodporność dotyczy również społeczeństwa mieszkającego na wsi. Dostępne publikacje naukowe potwierdzają fakt, że w regionach o intensywnej produkcji zwierzęcej stosuje się silniejszą terapię antybiotykową w leczeniu chorób u ludzi, niż w podobnych przypadkach w mieście. Ten fakt stał się przyczyną zmiany podejścia do dalszej intensyfikacji produkcji zwierzęcej i kierunków doskonalenia krów mlecznych w stronę wyboru zwierząt odpornych i żywotnych, dobrze dostosowanych do lokalnych warunków produkcji. Selekcja zwierząt hodowlanych jest jedną z proponowanych metod ograniczania przypadków zapaleń wymienia w stadzie. Innym rozwiązaniem tego problemu jest ukierunkowanie badań na poszukiwanie markerów diagnostycznych oraz alternatywnych procesów terapeutycznych, szczególnie w przypadku wystąpienia formy podklinicznej mastitis.

Skłonność krów do zapaleń wymienia uwarunkowana jest nie tylko genetycznie. Ma ona również silne podłoże środowiskowe związane przede wszystkim z jakością żywienia i utrzymania zwierząt, jak również z techniką i higieną doju. Źle wyregulowane i niekonserwowane urządzenia udojowe w znacznym stopniu zwiększają ryzyko uszkodzeń

tkanki gruczołu sutkowego lub zwieraczy strzyków, tym samym ułatwiając wnikniecie patogenów do wnętrza wymienia.

Jeszcze w 1950 r. jedna krowa mleczna produkowała w Polsce około 2650 kg mleka rocznie. Dzisiaj przeciętny holsztyn produkuje średnio ponad 11 500 kg mleka, a nagrodzona w 2017 roku krowa, Selz-Pralle Aftershock 3918, wyprodukowała 39 095 kg mleka czyli ponad 100 kg każdego dnia. Powstaje zatem pytanie, czy tak prowadzona hodowla zmierzająca do osiągania coraz większych wydajności mlecznych i oparta na bliżej lub dalej spokrewnionych ze sobą osobnikach nie jest ślepym zaułkiem ? Obecnie wiele związków hodowlanych podjęło walkę z tą niekorzystną tendencją, panującą w hodowli bydła. W stosowanych indeksach selekcyjnych coraz większe wagi ekonomiczne przypisuje się takim cechom użytkowym jak: długowieczność, płodność, budowa ciała sprzyjająca poprawie cech motorycznych i optymalizacji formy wymienia i strzyków. U ras dwustronnie-użytkowych zwiększa się ponownie wagę cech użytkowości mięsnej lepiej skorelowanych z cechami zdrowotnymi bydła. W indeksie selekcyjnym bydła rasy simentalskiej w Austrii 38% stanowią cechy użytkowości mlecznej, 18% mięsnej, a 44% cechy związane z płodnością i zdrowiem. W tym sensie praca doktorska mgr inż. Aleksandry Kalińskiej - Łukasiewicz wychodzi na przeciw oczekiwaniom hodowców bydła. Nie można bowiem przejść do porządku dziennego nad tym, że średnia długość użytkowania krów mlecznych w stadzie waha się w okolicy 2,5 laktacji. Krowy z reguły brakowane są z powodu niepłodności, bądź klinicznych stanów zapalenia wymienia i wysokiego poziomu komórek somatycznych w mleku. W rezultacie w wyniku wysokiego brakowania krów w stadzie, często w okolicy 30%, hodowca nie może skutecznie prowadzić selekcji własnych zwierząt w pożądanym kierunku, gdyż ma ciągły deficyt jałówek z własnego chowu. Jeśli chodzi o krowy mleczne, dopiero krowa w trzeciej laktacji zwraca rolnikowi nakłady na jej odchów od urodzenia do krowy pierwiastki. Dlatego coraz częściej cechę funkcjonalną jaką jest długowieczność włącza się do indeksów selekcyjnych i traktuje się z dużą uwagą. Długowieczność zawiera w sobie szereg cech związanych ze zdrowiem zwierzęcia w tym również odporność wymienia na infekcje bakteryjne.

Charakterystyka pracy

Na 111 stronach maszynopisu znajdziemy obszerny wstęp opisujący tło prowadzonych badań, hipotezy badawcze, cel i zakres pracy, materiał i metody badawcze wraz opisem przeprowadzonych analiz zebranego materiału, wyniki i ich omówienie oraz wnioski końcowe

będące podsumowaniem prac eksperymentalnych. Doktorantka załączyła ponadto wykaz zastosowanych w pracy skrótów, spis cytowanych artykułów liczący 58 pozycji oraz zbiór trzech publikacji, które są podstawą przedstawionego do recenzji rękopisu pracy doktorskiej. Rękopis został uzupełnionych o oświadczenia współautorów publikacji i załącznik numer 1 będący podsumowaniem dotychczasowych osiągnięć naukowych i publikacyjnych mgr inż. Aleksandry Kalińskiej – Łukasiewicz. W tabeli nr 1 zawarte jest sumaryczne zestawienie dorobku publikacyjnego doktorantki.

Zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej stanowią następujące pozycje:

1. **KALIŃSKA A.,** WÓJCIK A., SLÓSARZ J., KRUZIŃSKA B., MICHALCZUK M., JAWORSKI S., WIERZBICKI M., GOŁĘBIEWSKI M., 2018: Occurrence and aetiology of Staphylococcal *mastitis* - a review. *Animal Science Papers & Reports*, 36(3): 263-273 (40 pkt.*, IF 0,697*)
2. PUPPEL K., **KALIŃSKA A.,** KOT M., SLÓSARZ J., KUNOWSKA-SLÓSARZ M., GRODKOWSKI G., KUCZYŃSKA B., SOLARCZYK P., PRZYSUCHA T., GOŁĘBIEWSKI M., 2020: The effect of *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and Enterobacteriaceae on the development of whey protein levels and oxidative stress markers in cows with diagnosed mastitis. ***Animals***, 10(9): 1591. https://doi.org/10.3390/ani10091591 **(100 pkt., IF 2,752)**
3. **KALIŃSKA A.,** JAWORSKI S., WIERZBICKI M., GOŁĘBIEWSKI M., 2019: Silver and copper nanoparticles—an alternative in future mastitis treatment and prevention? ***International Journal of Molecular Sciences***, 20(7): 1672. https://doi.org/10.3390/ijms20071672 **(140 pkt., IF 4,556)**

Co stanowi razem: 280 pkt., IF 8,005. W dwóch z nich jest pierwszym autorem, a jednej drugim.

W obszernym wprowadzeniu mgr inż. Aleksandra Kalińska - Łukasiewicz zdefiniowała pojęcie mastitis i przyczyny występowania tej choroby w stadzie. Stan zapalny gruczołu mlekowego, jak podkreśliła, jest jedną z najczęstszych chorób występujących w stadach bydła mlecznego, która istotnie wpływa na wzrost kosztów produkcji i pogorszenie dobrostanu zwierząt. Szacuje się, że chore zwierzęta przynoszą gospodarstwu straty w wysokości około 1000 PLN na krowę. Zapalenie wymienia wpływa również na pogorszenie jakości mikrobiologicznej, cytologicznej i technologicznej mleka. Chore osobniki są też rezerwuarem patogenów w stadzie. Zapalenie wymienia występuje w dwóch postaciach: klinicznej i subklinicznej. Zmiany kliniczne są dobrze widoczne w postaci obrzęku lub zaczerwienienia wymienia, bólu lub podwyższonej temperatury. Również w mleku można rozpoznać zmiany w postaci skrzepów (m.in. grudki, kłaczki), spowodowane reakcją układu immunologicznego krowy. W stadach bydła przeważa jednak trudniejsza do wykrycia postać subkliniczna tej

choroby, która przebiega bezobjawowo, a jedynym jej wskaźnikiem jest podwyższona liczba komórek somatycznych (LKS) w mleku.

W przestawionej do oceny pracy zwraca uwagę zamieszczony sugestywny rysunek przedstawiający stado bydła mlecznego z uwzględnieniem, w pierwszym przypadku, tylko krów z klinicznym *mastitis*, a w drugim krów z klinicznymi i subklinicznymi postaciami *mastitis.* Jest to opracowanie własne doktorantki. Zwłaszcza ten drugi przypadek sugeruje, że problem jest niezwykle poważny. Jak wspomniała w swoim wprowadzeniu doktorantka, zwłaszcza profilaktyka zakażeń patogenami przenoszonymi w stadzie z krowy na krowę, głównie podczas procesu dojenia, ma w tym przypadku duże znaczenie. Niestety drobnoustroje środowiskowe występujące w otoczeniu krów mlecznych biorące udział w procesie zapalnym wykazują coraz mniejszą podatność na antybiotyki. Dlatego, oprócz modernizacji systemów utrzymania i doju krów mlecznych, poprawy jakości żywienia i mikroklimatu w budynkach gospodarczych, poszukuje się nowych alternatywnych substancji i rozwiązań mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu i profilaktyce *mastitis*. Jedną z nich jest wykorzystanie roztworów nanocząsteczek metali szlachetnych oraz ich zdolności do synergistycznego oddziaływania między sobą, a także z innymi substancjami aktywnymi. Nanocząstki metali szlachetnych posiadają właściwości antybakteryjne i ich zastosowanie mogłoby pozwolić na skrócenie okresu terapii, jednocześnie zwiększając jej skuteczność, pomimo antybiotykooporności bakterii.

Nanocząstki metali m.in. srebra i miedzi z powodzeniem stosuje się w chemii gospodarczej, w środkach dezynfekcyjnych i myjących oraz przemyśle kosmetycznym. Często na opakowaniach spotykamy napisy o wykorzystaniu nanotechnologii w produkcji tej czy innej substancji. Pomysł mgr inż. Aleksandry Kalińskiej – Łukasiewicz praktycznego wykorzystania nanocząstek srebra i miedzi, jako alternatywy dla tradycyjnych środków przeciwbakteryjnych i antybiotyków w profilaktyce zapaleń gruczołu mlekowego mógłby spełnić oczekiwania producentów mleka i lekarzy weterynarii. Jedną z najważniejszych zalet zastosowania tej metody jest brak ryzyka wystąpienia oporności na NPs (nanocząstki). Drugim ważnym aspektem jej zastosowania mogłaby by być redukcja ilości stosowanych antybiotyków w profilaktyce i terapii tej choroby. Profilaktyka *mastitis* to, jak na razie, najskuteczniejsza i najlepsza dla zwierząt metoda przeciwdziałania zapaleniu wymienia.

Postawione przez mgr inż. Aleksandrę Kalińską – Łukasiewicz hipotezy badawcze, cele i zakres pracy wskazują na kompleksowe podejście do badań nad przydatnością nanocząstek srebra i miedzi w profilaktyce zapaleń wymienia u krów. Słusznie też założono, że białka

serwatkowe mogą być markerami diagnostycznymi zapalenia gruczołu mlekowego, co w dużym stopniu ułatwiłoby wykrywanie zapalenia wymienia i kontrolę skuteczności zastosowanej terapii. Założono też, że nanocząstki srebra (AgNPs) i miedzi (CuNPs) nie będą miały toksycznego wpływu na tkankę gruczołu mlekowego badanych linii komórkowych BME-UV1 (bydlęce) oraz HMEC (ludzkie) i mają właściwości antybakteryjne.

Podjęta w pracy doktorskiej tematyka badań związana była z realizacją następujących celów badawczych :

1. Zbadanie wpływu *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. i *Enterobacteriaceae* na sekrecję bioaktywnych białek serwatkowych i kształtowanie się poziomu markerów stresu oksydacyjnego w mleku krów.
2. Zbadanie wpływu (toksyczności) dostępnych na rynku NPs i wytworzonego na ich podstawie kompleksu na ludzkie i bydlęce linie komórkowe gruczołu mlekowego.
3. Zbadanie wpływu (toksyczności) dostępnych na rynku NPs i wytworzonego na ich podstawie kompleksu na przeżywalność patogenów i drożdży wywołujących zapalenie wymienia (np. *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans*).

Opisany przez mgr inż. Aleksandrę Kalińską - Łukasiewicz zakres i metodologia badań dotyczyły działań zmierzających do potwierdzenia założonych hipotez badawczych i nie budzą zastrzeżeń recenzenta.

Doktorantka podjęła się zatem określenia zależności między patogenami wywołującymi stan zapalny gruczołu mlekowego a układem odpornościowym krowy, a także między poziomem białek serwatkowych, a szczepami patogenów mastitowych oraz między poziomem białek serwatkowych, a ilością LKS i CFU (kolonii bakteryjnych) w mleku krów.

W toku dalszych badań mgr inż. Aleksandra Kalińska - Łukasiewicz oceniła właściwości fizykochemicznych AgNPs i CuNPs AgCuNPs wykorzystanych w doświadczeniach, potencjału Zeta oraz rozkładu wielkości. Oznaczyła też wielkości oraz struktury NPs i wytworzonego przez nie kompleksu oraz określiła stopień toksyczności AgNPs, CuNPs i AgCuNPs w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem komórek tkanki gruczołu mlekowego linii bydlęcej (BME-UV1) oraz ludzkiej (HMEC). Oceniła też żywotność komórek HMEC i BME-UV1 po traktowaniu ich nanocząstkami AgNPs, CuNPs i AgCuNPs.

W badaniach nie pominięto również, cytuję: „przeprowadzenia oceny integralności błon komórkowych nabłonkowych komórek sutkowych po traktowaniu AgNPs, CuNPs i AgCuNPs", co miało duże znaczenia dla ustalenia optymalnych stężeń AgNPs, CuNPs i AgCuNPs mających

działanie bakteriobójcze dla patogenów z gatunków: *Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterobacter cloace, Streptococcus agalactiae, Candida albicans.* Zacytowane sformułowanie wydaje się być niespójne z tekstem zawartym w publikacji angielskojęzycznej, w którym jest mowa o komórkach gruczołu sutkowego, albo o błonie tych komórek. Proponuję uściślić polską terminologię tego opisu.

Badania *in vitro* zostały przeprowadzone w laboratoriach Katedry Hodowli Zwierząt, Instytutu Nauk o Zwierzętach, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Doświadczenia terenowe wykonane były w Rolniczym Zakładzie Doświadczalnym Wilanów-Obory. Przeanalizowano 600 próbek mleka pobranych od 60 krów wieloródek z doju ćwiartkowego. Wybrane do doświadczenia krowy charakteryzowały się podwyższoną liczbą komórek somatycznych wskazującą na podkliniczny stan zapalenia wymienia. Krowy nie były poddawane terapii antybiotykowej.

Na uwagę zasługuje wykorzystanie przez doktorantkę nowoczesnych metod laboratoryjnych do oceny jakości cytologicznej pobranego mleka, określenia poziomu aldehydu di-malonowego i potencjału antyoksydacyjnego TAS oraz koncentracji białek serwatkowych. Wykorzystano Test PrestoBlue® (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) – w ocenie potencjału oksydoredukcyjnego komórek gruczołu sutkowego linii bydlęcej (BME-UV1) i człowieka (HMEC) oraz do określenia żywotności patogenów wywołujących zapalenia wymienia u bydła. Potencjał Zeta wybranych nanocząstek i kompleksu AgCuNPs został oznaczony za pomocą aparatu Zetasizer Nano ZS. Rozkład wielkości nanocząstek oznaczono poprzez analizę zdjęć uzyskanych dzięki wykorzystaniu elektronowego mikroskopu transmisyjnego oraz ocenę ich wielkości hydrodynamicznej. W tym celu przygotowano również do badań hodowle komórkowe gruczołu sutkowego linii bydlęcej i człowieka.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem procedury GLM, w której na poziom bioaktywnych białek serwatkowych i markeru stresu oksydacyjnego (MDA) zbadano wpływ LKS i poszczególnych szczepów bakteryjnych (*Enterobacteriaceae, Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.). Istotność różnic pomiędzy poziomami czynnika oszacowano testem Duncana. Liczbę bakterii przedstawiono jako log CFU/ml mleka, czyli liczby jednostek tworzących kolonie w 1 ml mleka. W analizie statystycznej zastosowano podział na trzy grupy krów uwzględniając liczebność poszczególnych kolonii bakterii: 0 CFU/ml, 0,1–1 CFU/ml i >1,1 CFU/ml. Grupa kontrolna składała się z krów, które wyleczyły stan zapalny lub zabiły patogen zapalenia strzyka o ilości 0 CFU/ml, które były odniesieniem do

porównania z mlekiem krów zakażonych o CFU od 0,1–1,0 i >1,1 CFU/ml. Krowy podzielono również na trzy grupy pod względem LKS. W pierwszej LKS była <200 000 komórek/ml, w drugiej wahała się od 200 000 do 400 000 komórek/ml, a w trzeciej była większa niż 400 000 komórek/ml. Grupa kontrolna składała się z próbek mleka krów o LKS <200 000.

Wyniki doświadczenia wykazały istotną zależność między stężeniem MDA, a LKS (P≤0,01). Wysoki poziom MDA (28,749 nM/ml) (nanomol/ml) uzyskano w mleku o LKS>400 000 komórek/ml, co sugeruje, że krowy były narażone na stres oksydacyjny. Wykazano, że mleko o wyższej LKS zawiera więcej komórek wielojądrzastych, co sprzyja reakcjom oksydacyjnym. Wykazano również, że wysoki poziom TAS w mleku krów, w którym LKS <200 000/ml wskazuje, że zdrowe krowy mogą mieć wyższy potencjał antyoksydacyjny. Stężenie białek serwatkowych w mleku krów z zapaleniem wymienia jest wyższe niż u zdrowych krów.

Omawiając wyniki zakażenia florą bakteryjną mgr inż. Aleksandra Kalińska – Łukasiewicz stwierdziła, że szczepy *Enterobacteriaceae* z log CFU>1,1 mogą wywołać stres oksydacyjny (spadek TAS i zwiększenie zawartości MDA). Wykazała też istotną zależność między stężeniem MDA, a obecnością *Enterobacteriaceae* w badanym materiale (P≤0,01). W przypadku poziomów Lz i Lf stwierdzono zależność od CFU dla *Enterobacteriaceae* > 1,1 log CFU/ml. Otrzymane wyniki znajdują potwierdzenie w opublikowanych badaniach innych autorów. Obecność bakterii z rodzaju *Staphylococcus* spp. w mleku istotnie wpłynęła na wzrost stężenia BLG. W dyskusji omawiającej otrzymane wyniki doktorantka podkreśliła, że inni autorzy wykazali, że szczep bakterii *Staphylococcus aureus* jest przyczyną nawet do 44% klinicznych przypadków zapalenia wymienia. Za to BLG ma właściwości hamujące rozprzestrzenianie się *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus uberis* tym samym minimalizując ryzyko wystąpienia zapaleń wymienia w stadzie. Te same właściwości autorzy przypisali innym białkom serwatkowym: laktoferynie i lizozymowi, które działając wspólnie ograniczają rozwój bakterii gram-ujemnych.

W kolejnym doświadczeniu przeprowadzonym przez mgr inż. Aleksandrę Kalińską – Łukasiewicz określono potencjał oksydoredukcyjny komórek sutkowych bydła i człowieka poddanych ekspozycji na działanie kompleksu AgCuNPs. Oceniono żywotność nabłonka komórek sutkowych HMEC i BME-UV1 po traktowaniu roztworami AgNPs, CuNPs, AgCuNPs o różnym stężeniu. Wyniki przeprowadzonych testów zostały opracowane statystycznie za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Istotność różnic pomiędzy grupami oceniono testem Dunkana. Przeprowadzona przez doktorantkę ocena żywotności komórek

linii modelowych po traktowaniu nanocząsteczkami o stężeniu 0,1; 0,5; 1; 2; 2,5 mg/l wskazuje, że NPs nie zmniejszyły aktywności oskydoredukcyjnej komórek, a tym samym nie wykazały działania cytotoksycznego ($P<0,05$). Aktywność oksydoredukcyjna komórek linii BME-UV1 wzrosła po ekspozycji na AgNPs o stężeniu 0,5; 1 mg/ml oraz AgCuNPs o stężeniu 0,1; 0,5; 1 mg/l. W przypadku wyższych stężeń AgNPs oraz AgCuNPs aktywność oksydoredukcyjna komórek zmalała, ale doktorantka przypuszcza, że ten wynik mógł być skutkiem np. zakażenia hodowli. W przypadku linii HMEC takiej zależności nie zaobserwowano. Oceniono również integralność nabłonka komórek sutkowych HMEC i BME-UV1 po inkubacji z AgNPs, CuNPs, AgCuNPs. Stężenia 0,5; 1; 2; 2,5 mg/l AgNPs, CuNPs i w mniejszym stopniu CuNPs doprowadziły do zmniejszenia spontanicznego wypływu LDH (dehydrogenazy mleczanowej) o 20-60% i zwiększenia integralności nabłonka komórek HMEC. W przypadku komórek BME-UV1 zaobserwowano wzrost poziomu enzymu LDH, co potwierdza zmianę potencjału oksydoredukcyjnego komórek w wyższych stężeniach NPs. Przeprowadzona w pracy doktorskiej analiza statystyczna zebranego materiału doświadczalnego nie budzi zastrzeżeń recenzenta.

Otrzymane przez doktorantkę wyniki badań wskazują, że zastosowanie NPs zmniejszyło żywotność patogenów: *Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterobacter cloace, Streptococcus agalactiae* i drożdży *Candida albicans* w każdej grupie. Wyniki te potwierdzają również wcześniejsze badania innych autorów, w których AgNPs i CuNPs oraz ich kompleks wykazywały silne działanie przeciwbakteryjne, a stężenia ≥1 ppm mogą znaleźć zastosowanie w praktyce. W przedstawionych badaniach nanocząstki AgNPs wykazywały najsilniejsze działanie antybakteryjne, a żywotność patogenów w tym przypadku była najniższa ($P<0,01$). Dostępne publikacje i wyniki badań własnych doktorantki sugerują, że AgNPs i CuNPs i kompleks AgCuNPs mają silne działanie antybakteryjne i tym samym mogą być skutecznym rozwiązaniem profilaktyki zapalenia wymienia również ze względu na ich synergiczny wpływ na inne patogeny. Rodzi się zatem pytanie o koszt wprowadzenia takiej profilaktyki do stad bydła mlecznego i dostępność nanopreparatów na rynku. Sugerowałbym uwzględnić ten aspekt w kolejnych publikacjach na ten temat.

Ciekawym zagadnieniem byłoby też przeprowadzenie genotypowania grupy krów w stadzie wykazujących dużą odporność jak i małą odporność na mastitis pod względem obecności korzystnych polimorfizmów genów, głównie białek serwatkowych i zbadanie wpływu ich ekspresji na wydajność mleczną w powiązaniu z odpornością krów na zapalenie

wymienia. Wyniki badań przeprowadzonych przez mgr inż. Aleksandrę Kalińską – Łukasiewicz wydają się zachęcać do tego typu badań i analiz. Udowodniony antagonizm genetyczny pomiędzy wydajnością mleka i stanem zdrowotnym wymienia sprawia, że od wielu lat sytuacja w stadach krów mlecznych w tym zakresie ulega pogorszeniu. Nadzieję na jej poprawę może dać selekcja wspomagana markerami (MAS), w której wykorzysta się markery genetyczne do wyboru zwierząt mniej podatnych na zapalenie wymienia. Z tego właśnie powodu zainteresowano się związkiem pomiędzy genami BoLA klasy II a występowaniem mastitis u krów. Spośród genów BoLA klasy II najbardziej obiecujący wydaje się związek genu BoLA-DRB3 z odpornością na zapalenie wymienia. Gen ten koduje miejsce wiązania peptydów i może wpływać na rozpoznawanie obcych białek. Oprócz genu BoLa cztery inne geny zostały powiązane z odpornością na mastitis. Są to: OSTF1 gen kodujący czynnik regulatorowy (czynnik 1 stymulujący osteoclasty), AHCY działający jako inhibitor zależnej s-adenosyl-l-methionine-reakcji methyl transferasy, gen PRKDC kinazy białkowej zależnej od DNA i gen HNRPU, który wiąże się z pre-mRNA i jest składnikiem rybonukleosomów. Chcąc poprawić zdrowotność stada musimy nie tylko poprawić środowisko w którym żyją krowy, stosować odpowiednią profilaktykę, ale również zwrócić uwagę na te osobniki, które wyjątkowo dobrze przystosowały się do środowiska, w którym przebywają, są płodne, wykazują dobrą motorykę, nie zapadają na choroby metaboliczne i są odporne na zapalenie wymienia. Zespół takich cech nazywany jest obecnie „odpornością" i charakteryzuje zwierzę o wysokiej życiowej wydajności, krótkich okresach międzywycieleniowych, dobrej kondycji zdrowotnej i wydajności.

W podsumowaniu wyników doktorantka podkreśliła, że badane szczepy bakterii miały wpływ na sekrecję białek serwatkowych i poziom markerów stresu oksydacyjnego. Stan zapalny wywołany przez patogeny, jak stwierdziła, spowodował wzrost stężenia białek serwatkowych oraz obniżenie potencjału antyoksydacyjnego w mleku krów. Na podstawie badań stwierdzono, że lizozym i laktoferyna mogą być markerami diagnostycznymi zapalenia wymienia wywołanego przez *Enterobacteriaceae* i *Streptococcus* spp. Natomiast pomiar stężenia β-laktoglobuliny może okazać się przydatny w diagnozowaniu *mastitis* indukowanym przez *Staphylococcus* spp. Okazało się również, że Nanocząstki. AgNPs, CuNPs oraz kompleks AgCuNPs nie wpłynęły negatywnie na wzrost potencjału oksydoredukcyjnego komórek BME-UV1 i HMEC, co oznacza, że NPs nie miały cytotoksycznego działania na linie komórek gruczołu sutkowego bydła i człowieka. W związku z tym mgr inż. Aleksandra Kalińska – Łukasiewicz sugeruje, że badane nanocząstki srebra i miedzi, które istotnie zmniejszały żywotność

patogenów i wykazywały właściwości antybakteryjne i przeciwgrzybicze, mogą być alternatywą w leczeniu i profilaktyce *mastitis* u bydła.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji praca doktorska, składająca się z omówienia wyników trzech publikacji naukowych o sumarycznym IF = 8,005 i 280 punktów według klasyfikacji czasopism naukowych MEiN jest przeprowadzoną starannie analizą możliwości zastosowania nanocząstek srebra i miedzi oraz ich konglomeratu w profilaktyce zapalenia wymienia w stadach bydła mlecznego. Na uwagę zasługuje starannie przygotowana metodyka przeprowadzonych doświadczeń i rozszerzenie badań o białka serwatkowe i ocenę poziomu stresu oksydacyjnego, które mogą być, jak podkreślono, dobrym wskaźnikiem stanu zdrowotnego wymienia krowy i momentu zastosowania nanocząstek srebra i miedzi w leczeniu subklinicznego zapalenia wymienia. W oparciu o przeprowadzone badania należałoby pójść krok dalej i wdrożyć roztwory nanocząstejk srebra i miedzi o dobranym stężeniu w stadach bydła mlecznego. Ma to szczególne znaczenie w walce z nadmiernym wykorzystywaniem antybiotyków w terapii mastitis i związanym z tym niebezpieczeństwem przedostawania się pozostałości tych leków do mleka. Należałoby przedtem jednak upewnić się czy nanocząstki srebra i miedzi są również obecne w mleku i jeżeli tak, to opracować metodę ich usuwania lub określić długość karencji po zastosowaniu ich roztworów lub zastanowić się nad sposobem odfiltrowywania nanocząstek metali szlachetnych z mleka, które mogłyby negatywnie oddziaływać na organizm człowieka. Praca doktorska mgr inż. Aleksandry Kalińskiej – Łukasiewicz ma również duże walory poznawcze i praktyczne. Może służyć jako przewodnik dla praktyków zajmujących profilaktyką i leczeniem zapalenia wymienia u krów. Na uwagę zasługuje staranna forma przygotowania rękopisu jak i znaczny dorobek publikacyjny doktorantki, liczący 148 pozycji, opisany szczegółowo w załączonym do pracy autoreferacie. Sumaryczny IF opublikowanych prac naukowych wynosi 13.67 i 520 pkt MEiN, index H = 4.

Wniosek końcowy

Oceniając wysoko poziom naukowy i oryginalność uzyskanych wyników stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Aleksandry Kalińskiej - Łukasiewicz pt. **„Wykorzystanie nanocząstek srebra i miedzi w zwalczaniu patogenów wywołujących *mastitis* u krów mlecznych"** spełnia wymogi określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach

naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późn. zmianami) oraz w przepisach wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. Zmianami). Dlatego zgłaszam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie o przyjęcie pracy mgr inż. Aleksandry Kalińskiej – Łukasiewicz i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Również z powyższych względów zgłaszam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie o wyróżnienie pracy mgr inż. Aleksandry Kalińskiej – Łukasiewicz.

dr hab. Tomasz Sakowski

Dr. Neb. Power Schools