Dr hab. Aldona Kawęcka prof. IZ
Zakład Hodowli Owiec i Kóz
Instytut Zootechniki - Państwowy Instytut Badawczy
32-083 Balice k. Krakowa

Kraków, 27.09.2022 r.

Recenzja pracy doktorskiej

lek. wet. Marii Milczarek

Zmiany profilu metabolomicznego kóz
w przebiegu naturalnego zakażenia lentiwirusem małych przeżuwaczy

Praca wykonana pod kierunkiem

prof. dr hab. Iwony Kosieradzkiej

Samodzielna Pracownia Żywienia Zwierząt, Instytut Nauk o Zwierzętach, SGGW

oraz prof. dr. hab. Jarosława Kaby

Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej,

Instytut Medycyny Weterynaryjnej, SGGW

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Dyrektora Instytutu Nauk o Zwierzętach dr hab. Marcina Gołębiewskiego, prof. SGGW z dn. 12.07.2022 r. zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW z dn. 18 czerwca 2019 r. w sprawie powołania na recenzenta rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do oceny praca dotyczy jednego z ważniejszych problemów z jakim spotykają się hodowcy kóz na całym świecie, tj wirusowego zapalenia stawów i mózgu kóz (ang. caprine arthritis-encephalitis, CAE). Ta jedna z najważniejszych chorób zakaźnych kóz jest wywoływana przez lentiwirusa małych przeżuwaczy (ang. small ruminant lentivirus, SRLV). CAE jest od wielu lat diagnozowane także w Polsce, a odsetek zakażonych stad, w których zakażonych jest nawet 90-100% zwierząt, dochodzi do 70%. Zakażenie SRLV ma charakter dożywotni i prowadzi do przewlekłej, postępującej choroby, często o przebiegu subklinicznym. Postaci klinicznej towarzyszą różnorodne objawy; najczęściej są to zmiany zapalne w obrębie stawów, w płucach (przewlekłe zapalenie płuc), w wymieniu (zapalenie wymienia), rzadko w obrębie centralnego układu mózgowego (zapalenie mózgu obserwowane sporadycznie u młodych koźląt). Choroba prowadzi z czasem do bolesnej kulawizny oraz utraty kondycji i wyniszczenia organizmu zwierzęcia, a w dłuższej perspektywie nawet do śmierci.

Brak możliwości zarówno leczenia, jak i immunoprofilaktyki choroby, brak skutecznego leku antywirusowego powoduje często konieczność przyspieszonego i zwiększonego brakowania w stadzie, co wpływa na efekt ekonomiczny hodowli. Wszystkie programy zwalczania choroby są oparte na badaniach serologicznych zwierząt, a rutynowa diagnostyka laboratoryjna CAE opiera się na testach wykonywanych metodą immunoenzymatyczną (ELISA). Diagnostyka zakażeń nie jest jednak doskonała ze względu na wciąż niewystarczająca czułość i swoistość diagnostyczną, czy konieczność powtarzania badań ze względu na długi okres serokonwersji, dlatego istnieje konieczność poszukiwania alternatywnych metod.

Badania będące przedmiotem niniejszego opracowania dotyczyły możliwości wykorzystania metabolomiki w diagnostyce CAE. Autorka podjęła próbę zastosowania w diagnostyce zakażeń kóz SRLV innych niż stosowane dotychczas metod analitycznych czyli wykorzystanie ilościowego pomiaru stężenia mikroelementów i metabolitów. W tym celu przeprowadzono kilka doświadczeń, a ich wyniki przedstawiono w pracach oryginalnych, które stanowią podstawę dysertacji.

Przedstawiona do oceny praca zawiera streszczenie oraz słowa kluczowe w jęz. polskim i angielskim, wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, spis treści, listę objaśnień skrótów zastosowanych w tekście rozprawy oraz opis pracy doktorskiej, która została podzielona na rozdziały: *Wstęp*, *Cel i hipoteza badawcza*, *Materiał i metody*, *Wyniki*, *Omówienie wyników*, *Wnioski*, *Piśmiennictwo*. W rozdziale *Załączniki*, znalazły się kopie pełnych wersji publikacji, składających się na oceniane osiągnięcie oraz oświadczenia o indywidualnym udziale współautorów.

We wstępie Autorka krótko omówiła stan chowu i hodowli kóz w Polsce, występowanie oraz epidemiologię wirusowego zapalenia stawów i mózgu kóz, objawy kliniczne i przebieg choroby oraz jej wpływ na produkcyjność kóz. Autorka przedstawiła syntetycznie stosowane w diagnostyce laboratoryjnej metody wykrywania zakażenia. Ostatni podrozdział *Wstępu* omawia wykorzystanie metabolomiki, nowej dziedziny nauki zajmującej się jakościową i ilościową analizą metabolomu, w diagnostyce chorób.

W rozdziale *Cele rozprawy* przedstawiono trzy cele szczegółowe, zbieżne z poszczególnymi etapami pracy oraz treścią publikacji zawartych w cyklu.

Rozdział *Materiał i metody* zawiera szczegółowy opis materiału do badań, metod laboratoryjnych oraz analizy statystycznej.

Rozdział *Omówienie głównych wyników przeprowadzonych badań* przedstawiono w formie streszczenia wyników badań poszczególnych prac składających się na cykl.

Celem badań przedstawionych w pracy opublikowanej w czasopiśmie Polish Journal of Veterinary Science było określenie stężenia wybranych mikroelementów we krwi i tkance wątrobowej kóz z zaawansowaną postacią kliniczną CAE. Autorzy tej pracy stwierdzili, że stężenia wszystkich badanych mikroelementów w tkance wątrobowej oraz miedzi w surowicy mieściły się w literaturowych zakresach referencyjnych, a w przypadku stężenia cynku, manganu i selenu w surowicy zakresy referencyjne były przekroczone.

Określenie stężenia wybranych metabolitów w surowicy dorosłych kóz rasy saaneńskiej oraz wykrycie różnic w profilu metabolicznym między kozami z bezobjawowym zakażeniem SRLV i kozami wolnymi od zakażenia SRLV było celem pracy opublikowanej w Small Ruminant Research. Stężenie tylko dwóch metabolitów, pochodnych aminokwasów (karnozyna i symetryczna dimetyloarginina) różniło się istotnie między kozami zakażonymi SRLV i wolnymi od zakażenia i było ono istotnie niższe u kóz zakażonych SRLV.

Określenie zmian w profilu metabolicznym młodych kozłów oraz wykrycie metabolitów, których zmiany stężenia w surowicy w ciągu pierwszych 2 lat życia mogą wskazywać na zakażenie SRLV było celem trzeciego eksperymentu, opublikowanego również w Small Ruminant Research. Stężenie 23 metabolitów różniło się istotnie między kozłami zakażonymi i wolnymi od zakażenia SRLV w różnych punktach czasowych badania, przy czym zdecydowana większość (21 z 23 metabolitów) w wieku 6 miesięcy, a dwa pozostałe w wieku 24 miesięcy.

Autorka podsumowała uzyskane wyniki czterema wnioskami, z których dwa pierwsze odnoszą się do dwóch pierwszych publikacji, a dwa pozostałe do ostatniej z prac. Rozdział *Piśmiennictwo* zawiera 60 pozycji literatury. Na końcu pracy zamieszczono zbiór publikacji naukowych wchodzących w skład pracy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów publikacji naukowych wchodzących w skład pracy doktorskiej.

Przedstawione do oceny opracowanie, będące podstawą dopuszczenia do kolejnych etapów ubiegania się o stopień doktora nauk rolniczych, zawiera omówienie 3 oryginalnych prac oraz ich kserokopie. Łączna liczba punktów MNiSW tych prac wynosi 220, a sumaryczny IF wynosi 3,222. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszą autorką , a jej indywidualny wkład w każdą z prac, potwierdzony oświadczeniami współautorów wynosi 65%.

Prace oryginalne, będące postawą niniejszej rozprawy zostały opublikowane w latach 2018-2019 w recenzowanych czasopismach, są zatem ocenione przez ekspertów, dlatego szczegółowa analiza i ocena wyników oraz ich interpretacji nie jest w recenzji konieczna, a opinia o ich wartości merytorycznej ogranicza się do poglądu, że stanowią one dobrą podstawę dla przygotowanej pracy doktorskiej.

Z obowiązku recenzenta chciałabym przedstawić uwagi jakie nasunęły się podczas czytania pracy, a które dotyczą innych aspektów niniejszego opracowania i powinny zostać wyjaśnione podczas publicznej obrony:

- We *Wstępie* w sposób syntetyczny Doktorantka wprowadziła czytelnika w zagadnienia sytuacji hodowli kóz w Polsce. Uważam jednak, że warto byłoby w tym miejscu nadmienić o istotnej zmianie w strukturze rasowej populacji, jaka miała miejsce w ostatniej dekadzie oraz zacytować bardziej aktualne publikacje dotyczące produkcji koziarskiej w Polsce.
- Przedstawione cele pracy dotyczą poszczególnych doświadczeń, dlatego moim zdaniem zasadne byłoby sformułowanie celu nadrzędnego, jakim jest podjęcie badań dotyczących możliwości zastosowania w diagnostyce zakażeń kóz SRLV ilościowego pomiaru stężenia mikroelementów i metabolitów.
- Ta sama uwaga dotyczy wniosków, które płyną z przeprowadzonych eksperymentów; warto byłoby sformułować podsumowanie, które zwieńczyłoby całość przeprowadzonych badań.
- Autorka nie przeprowadziła dyskusji po zaprezentowanych wynikach, zapewne uznając, że takowa znalazła się w poszczególnych recenzowanych pracach.
- Uwagi techniczne: załączone kopie prac są niekompletne, brakuje niektórych stron; brak pozycji piśmiennictwa Czopowicz i in., 2012 (lub błąd w dacie); należy oznaczyć cytowane pozycje piśmiennictwa tego samego autora wydane w tym samym roku różnymi literami.

Wniosek końcowy

Reasumując oceniam pozytywnie przedstawioną do oceny pracę autorstwa Pani lekarz weterynarii Marii Milczarek „Zmiany profilu metabolomicznego kóz w przebiegu naturalnego zakażenia lentiwirusem małych przeżuwaczy" i stwierdzam, że spełnia ona wymagania oraz kryteria stawiane rozprawom doktorskim, o których mowa w Ustawie z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669). **Wnoszę, zatem do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW o dopuszczenie Pani lekarz weterynarii Marii Milczarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Aleksandra Kawęcka