Olsztyn 26.09.2022 r.

**dr hab. Agata Bancerz-Kisiel, prof. uczelni**
Katedra Epizootiologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

---

# RECENZJA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Marii Milczarek** pt. **„Zmiany profilu metabolomicznego kóz w przebiegu naturalnego zakażenia lentiwirusem małych przeżuwaczy"**, wykonanej pod kierunkiem promotorów – prof. dr hab. Iwony Kosieradzkiej i prof. dr hab. Jarosława Kaby, w Instytucie Nauk o Zwierzętach oraz Instytucie Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

## Podstawa formalna

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi uchwała Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, z dnia 17 kwietnia 2018 roku.

## Oryginalność, aktualność i przydatność podjętego problemu naukowego

Doktorantka podjęła się badań nad zmianami w profilu metabolomicznym kóz naturalnie zakażonych lentiwirusem małych przeżuwaczy – czynnikiem etiologicznym wirusowego zapalenia stawów i mózgu kóz (CAE), choroby powodującej wyniszczenie zwierząt i znaczne obniżenie ich produkcyjność. Diagnostyka CAE jest bardzo trudna ze względu na latentny charakter zakażenia i długi okres bezobjawowy. Doktorantka podjęła się, po raz pierwszy w historii, określenia stężeń szerokiego zestawu metabolitów w surowicy dorosłych kóz z bezobjawowym zakażeniem lentiwirusem małych przeżuwaczy oraz kóz wolnych od tego zakażenia. Po raz pierwszy badała także zmiany w profilu metabolicznym kozłów do 2 roku życia, zarówno tych z bezobjawowym zakażeniem lentiwirusem małych przeżuwaczy, jak i wolnych od zakażenia. Podjęte badania uważam za bardzo oryginalne, ważne i w pełni uzasadnione.

## Ocena formalna

Przedmiotem rozprawy doktorskiej lek. wet. Marii Milczarek jest jednotematyczny cykl 3 artykułów naukowych:

1) Milczarek M., Czopowicz M., Szara E., Szara T., Nalbert T., Kosieradzka I., Kaba J. The concentration of copper, zinc, manganese and selenium in the serum and liver of goats with caprine arthritis-encephalitis. Pol. J. Vet. Sci. 2018; 21: 715-720.

   $IF_{2018}$ = 0,802; punkty $MNiSW_{2018}$ = 20

2) Milczarek M., Czopowicz M., Witkowski L., Bereznowski A., Bagnicka E., Kosieradzka I., Kaba J. Metabolomic profile of adult Saanen goats infected with small ruminant lentivirus. Small Rumin. Res. 2019; 170: 12-18.

   $IF_{2019}$ = 1,210; punky $MNiSW_{2019}$ = 100

3) Milczarek M., Czopowicz M., Szaluś-Jordanow O., Witkowski L., Nalbert T., Markowska-Daniel I., Bagnicka E., Puchała R., Kosieradzka I., Kaba J. Metabolomic profile of young male goats seropositive to small ruminant lentivirus – A longitudinal study. Small Rumin. Res. 2019; 174: 135-140.

   $IF_{2019}$ = 1,210; punkty $MNiSW_{2019}$ =100

Sumaryczny IF prac wynosi 3,222, a punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki 220 punktów. Doktorantka jest pierwszą autorką we wszystkich 3 wieloautorskich publikacjach. Do prac dołączone zostały oświadczenia współautorów, z których wynika, że udział lek. wet. Marii Milczarek w powstaniu poszczególnych artykułów był znaczny (65% w każdej z prac), a rola wiodąca. W oświadczeniach zabrakło jedynie wskazania roli Doktorantki w procesie analiz laboratoryjnych, w których z pewnością uczestniczyła. Do pracy nr 3 brakuje także oświadczenia jednego ze współautorów – Ryszarda Puchały. Po jego dołączeniu udział procentowy wszystkich współautorów będzie wynosił 100% (a nie 99%).

Badania metabolomiczne zostały sfinansowane ze środków KNOW grant nr UMO-KNOW2016/SGGW/ESR3/01/3, umowa nr 05-1/KNOW2/2015. Badania serologiczne zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki grant nr 2013/09/B/NZ6/03514.

Wyposażenie i funkcjonowanie laboratorium, w którym wykonano część badań, możliwe było natomiast dzięki grantowi Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 9506/E-385/R/2018.

**Ocena merytoryczna**

Trzy artykuły wchodzące w skład pracy doktorskiej przygotowano w sposób charakterystyczny dla tego rodzaju opracowań naukowych. Po złożeniu do czasopism artykuły te zostały poddane merytorycznej ocenie przez kompetentnych specjalistów. Rolą recenzenta rozprawy doktorskiej jest zatem ocena spójności tematycznej cyklu publikacji i ich wspólna ocena merytoryczna.

We wstępie opracowania stanowiącego rozprawę, Doktorantka zaznajamia czytelnika ze specyfiką chowu i hodowli kóz w Polsce oraz charakterystyką CAE. Omawia występowanie choroby, jej epidemiologię, objawy kliniczne i przebieg w stadzie, a także wpływ choroby na produkcyjność kóz. W dalszej części charakteryzuje metody diagnostyczne, a na koniec przybliża zagadnienie metabolomiki i jej zastosowania w medycynie. W mojej ocenie ta analiza zgromadzonego piśmiennictwa (60 pozycji), poświęconego omawianym zagadnieniom, jest może nieco zbyt zwięzła. Szkoda, że lek. wet. Maria Milczarek nie opisała chociażby patogenezy CAE, która jest niezwykle ciekawa, a także nie rozbudowała nieco bardziej opisu obrazu klinicznego poszczególnych postaci choroby. Niemniej jednak, wstęp jest napisany w jasny sposób, stanowi dobrą podbudowę dla przedmiotu badań, uzasadniając jednocześnie potrzebę ich przeprowadzenia. Następnie Doktorantka przedstawia precyzyjnie zdefiniowane cele swoich badań, do których nie mam zastrzeżeń. Wybór metod i technik badawczych, jak również sposób ich zastosowania jest odpowiedni do tego typu badań i uzyskania wiarygodnych wyników. Nasuwa się jedynie pytanie, czy są doniesienia na temat różnicy w stężeniach poszczególnych mikroelementów oznaczanych w świeżo pobranych krwi i wątrobie, w porównaniu do materiału mrożonego. Rezultaty badań własnych lek. wet. Maria Milczarek opublikowała w jednotematycznym cyklu 3 artykułów naukowych.

W pierwszej pracy Doktorantka określała stężenia miedzi, cynku, manganu i selenu we krwi i tkance wątrobowej kóz z zaawansowaną postacią kliniczną CAE. Badaniom poddano 54 kozy, które wykazywały ciężkie objawy kliniczne i uzyskały dodatnie wyniki pośredniego testu immunoenzymatycznego w kierunku zakażenia lentiwirusem małych przeżuwaczy. Spośród czterech zbadanych mikroelementów najwyższe stężenia, zarówno w surowicy, jak i w tkance wątrobowej, stwierdzono w przypadku cynku. Stężenie miedzi było około 2-krotnie niższe niż

stężenia cynku, a stężenia selenu i manganu najniższe. W wątrobie natomiast stężenie manganu było znacznie wyższe niż selenu. Doktorantka nie zaobserwowała istotnej korelacji między stężeniem mikroelementów w surowicy i tkance wątrobowej. Stężenia wszystkich badanych mikroelementów w tkance wątrobowej oraz miedzi w surowicy mieściły się w zakresach referencyjnych, a w przypadku stężenia cynku, manganu i selenu w surowicy zakresy referencyjne zostały przekroczone.

Druga praca dotyczyła określenia stężenia szerokiego zestawu metabolitów w surowicy kóz oraz próby wykrycia różnic w profilu metabolicznym u kóz z bezobjawowym zakażeniem lentiwirusem małych przeżuwaczy, w porównaniu do kóz wolnych od tego zakażenia. Zbadano 24 kozy – 16 w pierwszej i 8 w drugiej laktacji. Zdecydowana większość zwierząt – ok. 70% wykazała dodani wynik pośredniego testu immunoenzymatycznego w kierunku zakażenia lentiwirusem małych przeżuwaczy. Jednocześnie kozy te nie wykazywały objawów klinicznych CAE. Spośród 188 metabolitów wykrywanych przez test metabolomiczny firmy Biocrates, stężenie 130 metabolitów (69%) było powyżej dolnej granicy wykrywalności. Stężenie 9 metabolitów – metioniny, fenyloalaniny, tyrozyny, kreatyniny, jednej sfingomieliny, trzech lizofosfatydylocholin i jednej fosfatydylocholiny, było istotnie wyższe u kóz w pierwszej laktacji, podczas gdy stężenie sarkozyny było istotnie wyższe u kóz w drugiej laktacji. Stężenie dwóch metabolitów – karnozyny i symetrycznej dimetyloargininy było istotnie niższe u kóz zakażonych lentiwirusem małych przeżuwaczy w stosunku do kóz wolnych od zakażenia.

Trzecia praca opisuje zmiany w profilu metabolicznym kozłów w przebiegu pierwszych 2 lat życia. Charakteryzuje także metabolity, których zmiany stężenia w surowicy, w ciągu pierwszych 2 lat życia, mogą wskazywać na zakażenie lentiwirusem małych przeżuwaczy. Badano 13 kozłów – u 7 z nich w ciągu pierwszego roku życia pojawiły się swoiste przeciwciała przeciwko lentiwirusowi małych przeżuwaczy. U pozostałych 6 przeciwciał nie stwierdzono aż do zakończenia badania, kiedy to zwierzęta osiągnęły wiek ponad 2 lat. Spośród 188 metabolitów wykrywanych testem metabolomicznym firmy Biocrates, stężenie 134 metabolitów (71%) było powyżej dolnej granicy wykrywalności. Stężenie aż 96 metabolitów (72% metabolitów, których stężenie udało się zmierzyć) zmieniało się istotnie w pierwszych 2 latach życia kozłów. Stężenie 57 metabolitów istotnie wzrosło i były to w większości fosfatydylocholiny. Stężenie 12 metabolitów istotnie spadło i były to głównie aminokwasy i aminy biogenne, a stężenie 27 metabolitów zmieniało się w sposób nieukierunkowany. Stężenie 23 metabolitów różniło się istotnie między kozłami zakażonymi i wolnymi od zakażenia

lentiwirusem małych przeżuwaczy w różnych punktach czasowych badania, przy czym zdecydowana większość – 21 z 23 metabolitów, w wieku 6 miesięcy, a dwa pozostałe w wieku 24 miesięcy.

Przeprowadzone badania pozwoliły Doktorantce na wyciągnięcie 4 szczegółowych wniosków, które zostały dobrze sformułowane i mają pokrycie w uzyskanych wynikach. Zabrakło natomiast krótkiej dyskusji całości uzyskanych rezultatów, która byłaby dobrym podsumowaniem opracowania. Pojawiają się także drobne błędy składniowe, czy interpunkcyjne, ale nie wpływają one w znaczący sposób na odbiór prezentowanych treści. Natomiast cykl artykułów przedstawionych jako podstawa pracy doktorskiej oceniam pozytywnie – jest spójny tematycznie i koncepcyjnie, a prezentowane wyniki ważne. Należy podkreślić, że większość badań prowadzonych przez lek. wet. Marię Milczarek przeprowadzana była w Polsce po raz pierwszy, co świadczy o nowatorskim charakterze otrzymanych wyników. Mają one również aspekt aplikacyjny.

**Podsumowanie i wniosek końcowy**

Przedstawiona do recenzji praca stoi na dobrym poziomie naukowym. Zastosowana metodyka odpowiada standardom obowiązującym w tego typu badaniach i nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka wykazała dobre opanowanie warsztatu badawczego, sprawność w prowadzeniu badań oraz interpretacji wyników, które stanowią istotny wkład do dotychczasowej wiedzy na temat zakażenia kóz lentiwirusem małych przeżuwaczy. Stwierdzam, że praca doktorska **lek. wet. Marii Milczarek** pt. „**Zmiany profilu metabolomicznego kóz w przebiegu naturalnego zakażenia lentiwirusem małych przeżuwaczy**", odpowiada wymogom określonym w art. 13 ust. 1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Przedkładam zatem Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Instytutu Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Marii Milczarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**dr hab. Agata Bancerz-Kisiel, prof. uczelni**