

Prof. dr habil. Jan F. Żmudziński

Puławy, 14.06.2021

Państwowy Instytut Weterynaryjny - PIB w Puławach

emeryt

ul. Ziemięckiej 9, 24-100 Puławy

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Porankiewicz zatytułowanej „**Zastosowanie substytutów antybiotyków konwencjonalnych w konserwacji nasienia knura**” wykonanej pod kierunkiem Prof. dr habil. Zdzisława Smorąga w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki – PIB w Balicach.

Podstawą formalną do przygotowania recenzji jest pismo dr Krzysztofa Dudy, Dyrektora Instytutu Zootechniki – PIB w Balicach z dnia 28.05.2021 powołujące się na uchwałę Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach z dnia 13.05.2021.

W 2005 roku ustanowiony został Narodowy Program Ochrony Antybiotyków w Polsce, którego mottem przewodnim jest hasło „Chrońmy antybiotyki”. Jednostką realizującą program był Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Centrum Doskonałości – Zespół Badań Mikrobiologicznych w Warszawie. Program odwoływał się do decyzji Komisji Europejskiej i rekomendacji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO). Rekomendacje te obowiązywały ministra zdrowia do monitorowania zużycia antybiotyków we wszystkich sektorach gospodarki i ochrony zdrowia. Celem Programu było i jest nadal stworzenie systemu, który zapobiegałby utracie skuteczności antybiotyków w leczeniu zakażeń i chorób zakaźnych człowieka. Jednym z elementów składowych Programu jest uzyskanie precyzyjnych informacji nt. aktualnego zużycia antybiotyków w medycynie, weterynarii i gospodarce ze szczególnym uwzględnieniem rolnictwa. Dane te i uzyskane na ich podstawie wnioski mają służyć racjonalizacji i optymalizacji stosowania antybiotyków w Polsce stosownie do wytycznych Komisji Europejskiej. O tym, że problem jest poważny świadczą alarmujące raporty o braku skuteczności leczenia antybiotykami zakażeń u ludzi.

Antybiotyki stosowane są również w hodowli zwierząt. Może to być przyczyną selekcji i rozprzestrzeniania się szczepów drobnoustrojów opornych, a te mogą przemieszczać się w łańcuchu żywnościowym, mogą zasiedlać przewód pokarmowy człowieka tworząc rezerwuary potencjalnych patogenów np. drobnoustroje z rodzaju *Salmonella*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* posiadających geny oporności. Szczepy jednego gatunku odporne na antybiotyki mogą przekazywać cechę oporności do drobnoustrojów innych gatunków. Oprócz leczenia zwierząt antybiotyki były stosowane jako dodatki paszowe w celu zwiększenia efektywności ekonomicznej hodowli. Przykładem może być stosowanie tetracyklin jako dodatków paszowych, co doprowadziło do selekcji szczepów opornych i antybiotyki z tej grupy utraciły skuteczność w leczeniu zakażeń u ludzi i zwierząt. Przykładów

można przytoczyć więcej i dlatego wiele krajów wprowadziło zakaz stosowania antybakteryjnych dodatków paszowych w hodowli i produkcji zwierzęcej. Dziś często lekarze w leczeniu szpitalnym obserwują oporność drobnoustrojów wyizolowanych z przypadków zapalenia płuc na szeroki panel antybiotyków i stają przed problemem braku skutecznego preparatu. W poszczególnych krajach tworzone są systemy monitorowania lekooporności drobnoustrojów i zużycia antybiotyków. Powstała Europejska Sieć Monitorowania Lekooporności. Co roku organizowana jest pod auspicjami WHO akcja świadomego stosowania antybiotyków i monitorowania lekooporności. W 2020 roku dzień ten wyznaczono w Europie na 18 listopada (European Antibiotic Awareness Day - EAAD). Celem tej inicjatywy jest podniesienie świadomości o występowaniu antybiotykooporności jako poważnego zagrożenia dla zdrowia publicznego i promowanie odpowiedzialnego stosowania antybiotyków. Organizowane są konferencje, prelekcje, spotkania pacjentów, pracowników służby zdrowia, lekarzy weterynarii, dziennikarzy, przedstawiciele przemysłu farmaceutycznego których celem jest upewnienie się, że te ważne leki stosowane są mądrze – jak podaje Europejska Agencja Leków (European Medicine Agency). Kampanię tę wspiera Europejskie Centrum Zwalczenia Chorób Zakaźnych (European Centers for Disease Control). Ze względu na ograniczoną liczbę dostępnych antybiotyków, zbliżone zakresy skuteczności i sposób działania na drobnoustroje firmy farmaceutyczne inwestują duże pieniądze w badania nad nowymi, często niekonwencjonalnymi terapiami zakażeń u człowieka. Badacze zwrócili uwagę właśnie na antybakteryjne peptydy (AMPs) jako dobrych kandydatów mogących zastąpić klasyczne antybiotyki.

I chociaż skala stosowania antybiotyków do konserwacji nasienia w odniesieniu do danych o ogólnym zużyciu antybiotyków w kraju jest niewielka, to uważam badania mgr inż. Joanny Porankiewicz nad zastosowaniem substytutów antybiotyków konwencjonalnych w konserwacji nasienia knura za ważne, wychodzące naprzeciw zaleceniom Światowej Organizacji Zdrowia i wpisujące się w strategię ochrony antybiotyków. Badania Doktorantki są tym bardziej aktualne, bo postanowiła przebadać skuteczność właśnie antybakteryjnych peptydów (AMPs).

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 104 strony i ma typową dla rozpraw doktorskich organizację tekstu. Obejmuje 10 rozdziałów: przegląd literatury, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, literatura, spis tabel, spis wykresów, spis zdjęć. Rozprawa zawiera również streszczenie w języku polskim i angielskim. Część graficzna dokumentująca wyniki badań zawiera 28 tabel, 8 wykresów oraz 5 zdjęć.

We wstępie, który Doktorantka zatytułowała „Przegląd literatury” omawia w czterech podrozdziałach zagadnienia związane z inseminacją loch nasieniem konserwowanym, rozcieńczalniki stosowane do konserwacji nasienia knura, drobnoustroje występujące w nasieniu i źródło ich pochodzenia. Obszernie Doktorantka opisała antybiotyki i antybiotykooporność oraz preparaty o działaniu antybakteryjnym.

Wstęp – przegląd literatury – dowodzi dobrej znajomości problematyki oraz literatury stanowiących podstawę do tematyki, którą Doktorantka zajmowała się w swoich badaniach.

W rozdziale zatytułowanym „Cel pracy” mgr inż. Porankiewicz przedstawiła jeden główny cel, którym było wykazanie aktywności antybakteryjnej substytutów antybiotyków wobec mikroflory nasienia knura, a także skomponowanie składu nowego rozcieńczalnika poprzez zastąpienie konwencjonalnych antybiotyków nowymi preparatami o działaniu antybakteryjnym.

W rozdziale „Materiał i metody” liczącym 10 stron, podrozdziale „Materiały” Doktorantka opisuje 8 substancji charakteryzujących się potencjalnym działaniem antybakteryjnym. Wyboru peptydów o działaniu antybakteryjnym dokonano we współpracy z firmą Lipofarm (Zbylewo, Polska), która to firma specjalizuje się w projektowaniu i syntezie substancji aktywnych biologicznie. Zsyntetyzowane substancje oczyszczano, liofilizowano i badano ich czystość metodą RP-HPLC a tożsamość potwierdzano techniką spektrometrii mas.

Zakresy stężeń badanych peptydów antybakteryjnych wybrano na podstawie danych z literatury określanych metodą MIC dla każdego peptydu wobec szczepów testowych.

W badaniach użyła Doktorantka nasienie 29 knurów reprezentujących 5 różnych ras, jednego mieszańca i 3 knurów linii hybrydowych. Każdy peptyd antybakteryjny był badany wobec nasienia 4 knurów, a kompozycja wybranych peptydów została przebadana na nasieniu 5 knurów. Przed dodaniem rozcieńczalnika do nasienia określano objętość ejakulatu, koncentrację i ruchliwość plemników, osmolowość i pH. Jako rozcieńczalnika referencyjnego, wobec którego badano parametry nasienia z rozcieńczalnikiem zawierającym badane peptydy antybakteryjne użyła Doktorantka rozcieńczalnika BTS/BTS-PLUS zawierającego gentamycynę, który jest rutynowo stosowany do rozrzedzania nasienia. Bazę do przygotowania rozcieńczalników z badanymi peptydami antybakteryjnymi stanowił Biosolwens Plus bez gentamycyny. Jako drobnoustroje testowe wykorzystano następujące mikroporganizmy: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serowar *enteritidis* pochodzące z Kolekcji Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu oraz *Streptococcus suis* I i *Streptococcus suis* II z banku szczepów Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach.

Jako podłoża mikrobiologicznych do namnażania wyżej wymienionych bakterii Doktorantka użyła 8 różnych podłoży, a wśród nich były podłoża uniwersalne i selektywne. Podłoża zakupiono od uznanych producentów (Oxoid, Thermo Scientific, Graso). Tożsamość drobnoustrojów potwierdzano testami znanych producentów wytwarzających zestawy do identyfikacji bakterii (API – Bio Merieux: API STAPH; API 20 STREP; API 20 E).

W podrozdziale „Metody” Doktorantka przedstawiła metody jakimi posługiwała się przy ocenie ruchliwości plemników, przeżywalności nasienia, ocenie mikrobiologicznej nasienia. Mając już szczepy testowe Doktorantka badała ich wrażliwość na wybrane peptydy metodą MIC – minimalnej koncentracji peptydu hamującej wzrost drobnoustroju. Ponieważ żaden z wybranych peptydów nie hamował wzrostu wszystkich drobnoustrojów użytych w badaniach Doktorantka postanowiła sporządzić miksy peptydów dobierając kompozycje tych mikсів w taki sposób, aby teoretycznie uzyskać hamowanie namnażania wszystkich bakterii użytych w doświadczeniu.

Po zastosowaniu takich rozcieńczalników Doktorantka badała ponownie ruchliwość i przeżywalność nasienia, oceniała występowanie zmian apoptotycznych, mierzyła transbłonowy potencjał mitochondrialny plemników zawieszonych w przygotowanych rozcieńczalnikach z peptydami.

Podsumowując tę część rozprawy można stwierdzić, że Doktorantka przedstawiła cel, koncepcję doświadczeń, użyte materiały i metody w sposób klarowny, zrozumiały, zaś metody badawcze są adekwatne do założeń jakie postawiła sobie w rozdziale „Cel pracy”.

Rozdział „Wyniki” obejmuje 52 strony tekstu, tabel, wykresów i zdjęć (str. 30-82). Wyniki oceny ruchliwości nasienia przedstawione w tabeli 2 wskazują, że ruchliwość plemników zawieszonych w rozcieńczalniku z dodatkiem daptomycyny ewidentnie zaczynała spadać od 6-go dnia w porównaniu do klasycznego rozcieńczalnika (BP) rozcieńczalnika bez gentamycyny (BP OG) i BTS. Wyniki cechują się istotnością statystyczną. Analogicznie zachowywało się nasienie w rozcieńczalniku z polimiksyną z tym, że istotny spadek ruchliwości zaznaczał się od 8 dnia przechowywania (Tabela 3). Odmienne zachowywało się nasienie zawieszone w rozcieńczalniku eksperymentalnym z dodatkiem daptomycyny i polimiksyny b (Tabela 4). Tutaj praktycznie ruchliwość nasienia nie zmieniała się przez okres obserwacji (13 dni) w porównaniu do nasienia zawieszonego w rozcieńczalnikach referencyjnych. Tabela 5 z kolei przedstawia wynik badania ruchliwości nasienia zawieszonego w rozcieńczalniku z dodatkiem peptydu Camel. Tutaj stężenie peptydu Camel 32 mcg/ml znamienne redukowało ruchliwość plemników i praktycznie od 6 dnia ruch plemników zamierał. Nieco słabiej, ale z zauważalną tendencją do obniżenia ruchliwości nasienia wpływała na plemniki koncentracja 4 mcg/ml peptydu Camel. Wyniki te cechowały się statystyczną istotnością. Na tle trzech wyżej ocenianych peptydów bardzo dobrze wypadł Palm-KK-NH₂. We wszystkich właściwie koncentracjach badanych obecność Palm-KK-NH₂ w rozcieńczalniku nasienia nie wpływała negatywnie na ruchliwość plemników i czas ich przeżywania w porównaniu do rozcieńczalników referencyjnych (Tabela 6). Kolejny peptyd – Pexiganan – w koncentracjach od 1 do 8 mcg/ml rozcieńczalnika nie wpływał w istotny sposób na ruchliwość plemników i czas ich przeżywania w okresie 12 dni (Tabela 7). Peptyd Temporin A w rozcieńczeniu 8 mcg/ml znacznie redukował ruchliwość plemników i czas ich przeżywania w stosunku do rozcieńczalnika zawierającego 4 mcg/ml i 2 mcg/ml peptydu oraz w porównaniu do rozcieńczalników referencyjnych (Tabela 8). Tendencje, które przedstawiono powyżej Doktorantka zobrazowała na bardzo czytelnych wykresach na stronach od 40 do 48 wraz z komentarzami.

Doktorantka przeprowadziła również ocenę ruchliwości nasienia wspomaganą komputerowo po pierwszym dniu przechowywania. Wyniki oceny zawarte są na stronach 47 – 53. Analiza ta potwierdziła tendencje przedstawione powyżej, a w podsumowaniu tych badań Doktorantka stwierdza, że peptyd Camel w stężeniu 32 mcg/ml oraz peptyd Temporin w stężeniu 8 mcg/ml oddziaływały negatywnie na ruchliwość i przeżywanie nasienia knurów.

W rozdziale 4.2 Doktorantka przedstawia badania mikrobiologiczne nasienia. W nasieniu nierozcieńczonym były obecne głównie ziarniaki (gronkowce, mikrokoki, kocuria) oraz pałeczki (proteus i pasteurilla). Natomiast przy badaniu nasienia rozcieńczonego przechowywanego w rozcieńczalnikach z dodatkiem peptydów oraz w rozcieńczalnikach

referencyjnych (438 próbek) bakterie izolowano ze 106 próbek (24,2%). Wśród izolowanej flory bakteryjnej były szczepy wytwarzające hemolizę typu α i β , wytwarzające oksydazę, były też bakterie, których nie udało się zidentyfikować zastosowanymi testami. Spektrum flory bakteryjnej izolowanej z nasienia wskazuje na to, iż była to flora saprofityczna, występująca ubikwitalnie. Ponieważ w okresie 18 dni przechowywania nasienia w rozcieńczalnikach zawierających Pexiganan i Temporin A nie zaobserwowano znaczących różnic w mikrobiomie nasienia, które pozwoliłyby określić skuteczność antybakteryjną tych peptydów Doktorantka zdecydowała podjąć próbę określenia ich aktywności wobec szczepów przyjętych jako testowe (wzorcowe). Ale w Tabeli 16 Doktorantka zaprezentowała wyniki badania mikrobiologicznego nasienia knurów po rozrzedzeniu w rozcieńczalniku z dodatkiem peptydu Pexiganan. Po analizie tej tabeli recenzujący doszedł do dość istotnych spostrzeżeń, a mianowicie: w przypadku knura A jeśli dodanie 8 mcg/ml Pexigananu do rozcieńczalnika spowodowało, że w kolejnych dniach przechowywania nasienia za wyjątkiem dnia 4-go nie izolowano drobnoustrojów, a przy stężeniach 4 mcg/ml i 2 mcg/ml izolowano drobnoustroje to oznaczałoby, że peptyd Pexiganan w stężeniu 8 mcg/ml skutecznie wyeliminował zanieczyszczenie nasienia drobnoustrojami, które dostały się do niego w trakcie pobierania. W przypadku knura B i knura D wszystkie stężenia peptydu Pexiganan wydaje się, że skutecznie wyeliminowały zanieczyszczenie bakteryjne nasienia po rozrzedzeniu go w rozcieńczalnikach zawierających ten peptyd. Wyniki te miałyby większą moc, gdyby Doktorantka zbadała mikrobiologicznie nasienie przed rozrzedzeniem. Pomimo tego zastrzeżenia wynik w przypadku knura A jest wartościowy, sugeruje skuteczność Pexiganonu i wskazuje kierunek w jakim należałoby prowadzić dalszą ocenę tego peptydu. Natomiast komentarz do tej tabeli zawarty na stronie 59 jest zbyt lakoniczny i chyba Doktorantka nie dostrzegła informacji jakie zawiera Tabela 16.

Podobnie analiza Tabeli 17 może sugerować, z zastrzeżeniami, które recenzujący przedstawił powyżej, że peptyd Temporin A w przypadku knura A i knura B w wyższych koncentracjach ograniczał zanieczyszczenia bakteryjne nasienia. Tu także wyniki sugerują kierunek w jakim należałoby prowadzić dalsze badania.

Tabela 18 przedstawia wyniki badania mikrobiologicznego nasienia knurów po 11 dniach przechowywania w rozcieńczalniku z dodatkiem daplomycyny. Wskazują one, że daplomycyna nie eliminowała skażenia bakteryjnego nasienia w porównaniu do dwóch rozcieńczalników referencyjnych zawierających gentamycynę. To, że w nasieniu knura rasy pietrain nie wykrywała Doktorantka bakterii może świadczyć o tym, iż narządy rozrodcze knura nie były zakażone, a pobieranie nasienia odbyło się z zachowaniem wszelkich zasad aseptyki.

Jak wynika z Tabeli 19 rozcieńczalnik z dodatkiem polimiksyny właściwie nie eliminował skażenia bakteryjnego w porównaniu do rozcieńczalników referencyjnych i ponownie nasienie knurów rasy pietrain było wolne od zanieczyszczeń bakteryjnych przez cały cykl doświadczenia, niezależnie od rozcieńczalnika w jakim zawieszono plemniki. Może to sugerować jakąś szczególną właściwość tej rasy.

Jak chodzi o gatunki drobnoustrojów izolowanych z nasienia była to flora bakteryjna warunkowo chorobotwórcza występująca dość powszechnie w środowisku hodowli zwierząt.

Doktorantka wskazuje, że w przypadku daptomycyny obserwowano wzrost na podłożach mikrobiologicznych bakterii Gram-ujemnych, co może sugerować skuteczność tego peptydu w eliminowaniu bakterii Gram-dodatnich. Uwaga ta jest cenna, bowiem w skojarzeniu z innym peptydem np. polimiksyną, na którą Doktorantka wskazuje na podstawie wyników badań mikrobiologicznych nasienia zawartych w Tabeli 19 (skuteczność w eliminowaniu bakterii Gram-dodatnich) można stworzyć kompozycję skutecznie eliminującą bakterie obu grup. I tę koncepcję Doktorantka poddała ocenie wykonując doświadczenie z rozcieńczalnikiem zawierającym oba peptydy: daptomycynę i polimiksynę, a wyniki przedstawiła w Tabeli 20. Z nasienia przechowywanego w takim rozcieńczalniku Doktorantka izolowała tylko drobnoustroje z rodzaju gronkowców, co, z kolei, może sugerować, iż kompozycja ta działa selektywnie.

Kolejna tabela – Tabela 21 – przedstawia wyniki oceny mikrobiologicznej nasienia rozrzedzonego rozcieńczalnikiem z dodatkiem peptydu Camel po 11 dniach przechowywania. Okazuje się, że zarówno stężenie 32 mcg/ml i 4 mcg/ml peptydu Camel skutecznie eliminowało zanieczyszczenia bakteryjne nasienia drobnoustrojami. O ile wynik ten może budzić pewne nadzieje na zastosowanie peptydu Camel jako dodatku eliminującego drobnoustroje z nasienia, to w kontekście uzyskanych przez Doktorantkę negatywnych wyników badań nad wpływem peptydu Camel na ruchliwość nasienia te ostatnie eliminują ten peptyd jako kandydata do rozcieńczalników nasienia. Chyba, że będą prowadzone dalsze badania nad koncentracją 4 mcg/ml peptydu Camel jako dodatku do rozcieńczalnika nasienia.

Tabela 22 zawiera ocenę mikrobiologiczną nasienia 4 knurów po 11 dniach przechowywania w rozcieńczalniku zawierającym peptyd Palm-KK-NH₂. Przy stężeniu 4 mcg/ml Palm-KK-NH₂ w nasieniu trzech knurów nie stwierdzono drobnoustrojów, a u jednego wyizolowano bakterie, których nie zidentyfikowano.

Kompilując wyniki badania ruchliwości nasienia z wynikami badań mikrobiologicznych Doktorantka stwierdza, że nie zawsze zanieczyszczenie bakteryjne było jednoznaczne z obniżeniem jakości nasienia. W próbkach, w których stwierdzono obecność *Proteus spp.* ruchliwość nasienia wynosiła maksymalnie 45% (5-45%), natomiast w niektórych próbkach zanieczyszczonych gronkowcami obserwowano nawet 80% (0 – 80%) plemników o ruchu postępowym.

Podsumowując ten etap badań Doktorantka stwierdziła, że nasienie wykazywało dużą zmienność składu zanieczyszczenia mikrobiologicznego, co nie pozwoliło, w sposób jednoznaczny, ocenić wpływu badanych peptydów na obecne w nasieniu bakterie w przeprowadzonym doświadczeniu. Recenzujący podziela stanowisko Doktorantki zauważając jednocześnie, że już samo podjęcie zagadnienia zastąpienia klasycznych antybiotyków innymi substancjami było niezwykle cenną inicjatywą w kontekście przedstawionym na wstępie recenzji. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań są cenne, gdyż wskazują kierunki w jakich należałoby pójść z dalszymi badaniami. Ponieważ wyniki badań z nasieniem zanieczyszczonym w sposób naturalny nie dały jednoznacznej odpowiedzi na temat skuteczności peptydów w eliminowaniu bakterii i chociaż Doktorantka przeprowadziła kompleksową identyfikację bakterii obecnych w nasieniu, to postanowiła zweryfikować

skuteczność wybranych peptydów w stosunku do szczepów bakterii testowych (wzorcowych), które uzyskała z kolekcji znanych laboratoriów mikrobiologicznych, a które reprezentowały grupy i rodzaje drobnoustrojów występujących w nasieniu pobranym od knurów. Jako antybiotyk referencyjny Doktorantka użyła gentamycyny. Wyniki tych badań znajdują się w Tabeli 23. Pexiganan, Camel, polimiksyna b w koncentracji 8 mcg/ml skutecznie eliminowały zarówno gronkowce jak i pałeczki Gram-ujemne. Kompozycja peptydów polimiksyna b i daptomycyna skutecznie eliminowała wszystkie szczepy testowe (wzorcowe) w stężeniach 8, 4 i 2 mcg/ml za wyjątkiem *Staphylococcus aureus*. Natomiast ani Temporin A, ani Tymozyna β_4 nie hamowały wzrostu bakterii testowych w zastosowanych koncentracjach. Najsilniejsze działanie wobec *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* wykazała polimiksyna b i to w stężeniach 1 – 8 mcg/ml. Doktorantka badała jeszcze różne kompozycje peptydów w stosunku do bakterii testowych. Wyniki tych badań znajdują się w Tabeli 24. Zarówno Paxiganan z daptomycyną jak i Camel z daptomycyną skutecznie eliminowały bakterie testowe w koncentracjach 16+2 mcg/ml i 8+1 mcg/ml. Pozostało jeszcze zbadać wpływ kompozycji peptydów na fizjologię nasienia. Wyniki tych badań przedstawia Tabela 25, Wykres 8 i Tabela 26. Ten etap badań Doktorantka podsumowała stwierdzeniem, że nie wystąpiły istotne różnice w przeżywaniu nasienia przechowywanego w rozcieńczalniku z dodatkiem peptydów Pexiganan i daptomycyny w porównaniu do pozostałych rozcieńczalników (referencyjnych), chociaż, jak pokazano na wykresie 8 wystąpiły zupełnie inne tendencje w ruchliwości nasienia poszczególnych knurów. Tylko ruchliwość plemników knura B i knura E pozostawała na niezmiennym poziomie przez okres 13 dni przechowywania w rozcieńczalniku z dodatkiem Pexiganana i daptomycyny w porównaniu do rozcieńczalników referencyjnych. Natomiast w nasieniu pochodzącym od knurów A, C i D rozrzedzonym rozcieńczalnikiem zawierającym peptydy Pexiganan i daptomycynę nie stwierdzano ruchu plemników po 6, 8 i 11 dniach przechowywania (odpowiednio). Także ocena występowania plemników apoptotycznych w nasieniu przechowywanym w rozcieńczalniku z dodatkiem peptydów Pexiganan i daptomycyna wypadła niezbyt korzystnie w porównaniu do rozcieńczalników referencyjnych.

Rozdział „Dyskusja” liczy 8 stron, na których Doktorantka przedstawiła analizę wyników własnych badań w konfrontacji z literaturą. Doktorantka omawia szczegółowo mikrobiologiczne zanieczyszczenia nasienia knura przedstawiając wpływ tego zanieczyszczenia na ruchliwość i zmiany morfologiczne plemników oraz zagrożenie dla samicy i nowonarodzonych prosiąt. Podkreśla, że w przeprowadzonych badaniach obserwowała zarówno brak zanieczyszczeń bakteryjnych w nasieniu, jak i dużą zmienność spektrum flory bakteryjnej w trakcie przechowywania nasienia we wszystkich badanych rozcieńczalnikach. Wykazała, że efekt bakteriobójczy rozcieńczalnika zależy od rodzaju bakterii i rodzaju osłony antybiotykowej. W literaturze jest wiele publikacji wskazujących na zalety peptydów jako substancji antibakteryjnej i to analiza literatury skierowała Doktorantkę do oryginalnej koncepcji wykorzystania tych związków jako substancji przeciwbakteryjnych do rozcieńczalników stosowanych do konserwacji nasienia. W swoich badaniach wykazała, że peptydy Camel, Temporin A wpływały negatywnie na plemniki knura, ale były też peptydy, jak Pexiganan, daptomycyna, które nie obniżały jakości nasienia, a wykazywały działanie przeciwbakteryjne. Doktorantka ma świadomość, iż przeprowadzone badania i uzyskane

wyniki nie pozwalają określić szczegółowo warunków zastosowania peptydów do konserwacji nasienia. Recenzujący chciałby jednakowoż podkreślić, że są to badania pionierskie nad zastąpieniem klasycznych antybiotyków innymi substancjami, a uzyskane przez Doktorantkę wyniki są cenne, wskazują bowiem kierunki w jakich należałoby pójść przy planowaniu kolejnych eksperymentów.

Rozprawę kończy 7 wniosków wyprowadzonych na podstawie uzyskanych wyników badań. W pewnym sensie są one powtórzeniem wyników badań. Wniosek 2 i 3 mogłyby by stanowić jeden wniosek, gdyż chodzi tu o wpływ wymienionych w nich peptydów na ruchliwość i czas przeżywania nasienia zawieszzonego w rozcieńczalnikach je zawierających. Wniosek 7 mógłby być ograniczony do sformułowania: „Uzyskane wyniki wskazują.....”

Na końcu rozprawy Doktorantka zamieściła wykaz literatury obejmujący 144 pozycje piśmiennictwa światowego i krajowego oraz spis tabel, wykresów i zdjęć.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że Doktorantka podjęła pionierską próbę zastąpienia klasycznych antybiotyków substancjami wykazującymi aktywność antybiotyczną. Dość dużą trudność stanowiło dobranie odpowiednich stężeń wybranych substancji – zamienników antybiotyków, gdyż Doktorantka poruszała się w dość wąskim zakresie pomiędzy koncentracją peptydu nie uszkadzającą plemników a koncentracją wykazującą siłę bakteriobójczą. Obszar ten można nazwać indeksem skuteczności badanego peptydu, analogicznie do indeksu terapeutycznego, który określa obszar, w którym klasyczny antybiotyk wykazuje działanie terapeutyczne nie wykazując jeszcze działania toksycznego. Ale jak wykazała Doktorantka spektrum zanieczyszczenia mikrobiologicznego nasienia, a także rasa knura, od którego pobrano nasienie miały wpływ na ocenę danego peptydu. Jednym z cennych aspektów pracy jest próba zastąpienia klasycznych antybiotyków innymi substancjami antybiotycznymi, co recenzujący kilkakrotnie wspomniał w niniejszej ocenie rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Porankiewicz.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia, które zauważyłem w trakcie czytania rozprawy:

- korzystnym byłoby uzupełnienie rozprawy o wykaz skrótów,
- tekst streszczenia angielskiego pomija dość chyba istotną informację zawartą w streszczeniu polskim,
- str. 9 „zakażenie nasienia” raczej zanieczyszczenie nasienia drobnoustrojami,
- str. 10 – spotykanymi w nasieniu – raczej występującymi w nasieniu,
- str. 10 – taksonomia – dotyczy Bacillus – nie można powiedzieć, że jest to „szczep wyżej wymienionych rodzajów bakterii” gdyż „wyżej wymienione” to są pałeczki i ziarniaki, a Bacillus jest laseczką i jest to inna grupa taksonomiczna. Wystarczyłoby podać, że np. wyosobniono również bakterie z innych grup taksonomicznych jak: Enterobacter, Bacillus, Klebsiella, Serratia,
- str. 10 – zamiast „nieruchliwe” - nie wykazujące ruchu,

- str. 10-11 – MRSA to *Staphylococcus aureus* a nie *S. epidermidis* I nie MRSE tylko MRSA,
- str. 14 - chyba przez pomyłkę w akapicie omawiającym antybiotyki stosowane do konserwacji nasienia zaliczono aminokwas tyrozynę. Wprawdzie jest ona składnikiem roztworów używanych do konserwacji nasienia, ale nie wykazuje działania typowego dla antybiotyków,
- str. 68 – użyto terminu „próba”, podczas gdy w rzeczywistości były to próbki nasienia,
- w rozdziale „Materiały i metody” brak informacji nt. testów analizy statystycznej jakie zastosowała Doktorantka do oceny wyników uzyskanych w eksperymentach.

Powyższe uwagi w niczym nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy i mają charakter uwag korekcyjnych.

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa mgr inż. Joanny Porankiewicz pt.: „Zastosowanie substytutów antybiotyków konwencjonalnych w konserwacji nasienia knura” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz warunkom określonym w §6. Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora, dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o dopuszczenie mgr inż. Joanny Porankiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Puławy, dn. 20.06.2021



Prof. dr hab. Jan F. Żmudziński