



dr hab. Jan P. Madej, prof. uczelni
Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. C.K. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Wrocław, 21.10.2024

O C E N A

rozprawy doktorskiej **mgr Ramesha Nirmali Wishna-Kadawarage**,
pt. „**In-ovo stimulation as a tool to improve gut health of broiler chickens**”
(Stymulacja in-ovo jako narzędzie do poprawy zdrowia jelit kurcząt brojlerów)

wykonanej pod kierunkiem promotora głównego prof. dr hab. inż. Marii Siwek-Gapińskiej, Katedra
Biotechnologii i Genetyki Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Politechniki Bydgoskiej
oraz promotora pomocniczego dr Rita M. Hickey, Teagasc food research centre, Moorepark,
Fermoy, Ireland

Podstawę formalną do wykonania recenzji Pani mgr. Rameshy N. Wishna-Kadawarage stanowi zawiadomienie przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo, dr hab. inż. Jakuba Bieseka, prof. PBS (3/RNCS.520.11.2024) z dnia 12 września 2024 r., zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Politechniki Bydgoskiej.

Podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora jest cykl trzech powiązanych ze sobą tematycznie artykułów naukowych:

1. Ramesha N. Wishna-Kadawarage, Martin Jensen, Szymon Powalowski, Rita M. Hickey and Maria Siwek, *In-vitro* screening of compatible synbiotics and (introducing) “prophybiotics” as a tool to improve gut health, *International Microbiology* (Springer), 2024, 27, 645–657, <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00417-2>,
2. Ramesha N. Wishna-Kadawarage, Rita M. Hickey and Maria Siwek, *In-vitro* selection of lactic acid bacteria to combat *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni* in broiler chickens, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Springer), 2024, 40, 133, <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03946-8>,

3. Ramesha N. Wishna-Kadawarage, Katarzyna Połtowicz, Agata Dankowiakowska, Rita M. Hickey and Maria Siwek, Prophybiotics for *in-ovo* stimulation; validation of effects on gut health and production of broiler chickens, Poultry Science (Elsevier), 2024, 103, 4, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103512>,

Wszystkie wymienione artykuły to prace oryginalne opublikowane w czasopismach z listy JCR o łącznym Impact Factor (wg danych z roku 2023) 10,1 i sumarycznej punktacji wg aktualnie obowiązującego wykazu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynoszącej 250 punktów. W każdej z prac Doktorantka jest pierwszym autorem.

Oceniana dysertacja składa się ze wstępu (4 strony), listy artykułów naukowych stanowiących cykl rozprawy doktorskiej, uzasadnienia spójności tematycznej w/w artykułów (48 stron), streszczenia w języku angielskim i polskim oraz kopii artykułów naukowych wraz z wymaganymi oświadczeniami Autorki i współautorów.

We **wstępie** Doktorantka zdefiniowała pojęcie zdrowego jelita, wskazując na związek kondycji tego narządu z prawidłową funkcją innych organów takich jak wątroba, mózg, gonady, płuca, skóra czy narząd wzroku. Jednocześnie zwróciła uwagę jak dynamicznie rosnąca ogólnoswiatowa produkcja brojlerów musi sprostać współczesnym standardom bezpiecznej żywności i ograniczeniom w stosowaniu antybiotyków. W wielkoskalowej produkcji kurcząt brojlerów, rozwój zarodka ptaka początkowo przebiega we względnie sterylnym środowisku jaja. Następnie po wykluciu podczas tzw. „okna wylęgowego” pisklę oczekuje zwykle 24-48h, a niekiedy nawet 72h, na pierwszy kontakt z pokarmem stanowiącym źródło bakterii komensalnych tworzących prawidłową mikrobiotę jelitową. Wczesna kolonizacja układu pokarmowego nie tylko stymuluje jego dojrzewanie, lecz równocześnie przyczynia się do zmniejszenia zagrożenia ze strony patogennych bakterii takich jak *Campylobacter* czy *Salmonella*. We wstępie Autorka scharakteryzowała ponadto technikę *in ovo* polegającą na podaniu substancji biologicznie czynnych bezpośrednio do jaja, a więc w trakcie rozwoju embrionalnego ptaka. Technika ta umożliwia suplementację między innymi prebiotyków, probiotyków, synbiotyków czy fitobiotyków dając lepsze rezultaty niż podanie tych samych substancji, w okresie po wykluciu piskląt z jaj. Nie bez znaczenia jest również termin iniekcji wybranych substancji do jaja, stąd zabieg wykonany w 12-tym dniu inkubacji określany jest jako stymulacja *in ovo*, w przeciwieństwie do działań w późniejszym okresie rozwoju (17-18 dzień) określanych mianem żywienia *in ovo*. Stymulacja *in ovo* różnymi substancjami bioaktywnymi wywiera korzystny wpływ na trawienie, metabolizm, rozwój mięśni, wydajność produkcji, ekspresję genów związanych z odpornością, reakcję na stres cieplny i łagodzenie zakażeń patogennych. Ponadto jest ona bezpieczniejsza niż analogiczny zabieg wykonany w późniejszym czasie, ze względu na mały rozmiar embrionu.

Hipoteza badawcza i cele pracy

Doktorantka, opierając się na opisanych we wstępie wynikach wcześniejszych badań innych autorów, postawiła hipotezę, że stymulacja *in ovo* kurcząt brojlerów starannie dobranymi substancjami bioaktywnymi powinna przeprogramować mikrobiom jelitowy i wzmocnić układ odpornościowy, aby aktywować bezpośrednie i pośrednie ścieżki wykluczenia patogenów w jelitach. Spodziewała się również, że te korzystne efekty będą trwałe aż do końca okresu produkcyjnego.

Jako główny cel niniejszej pracy doktorskiej Pani mgr. Ramesha N. Wishna-Kadawarage postawiła sobie optymalizację skutecznego protokołu stymulacji *in ovo* prowadzącego do poprawy zdrowia jelit u kurcząt brojlerów. Doktorantka wyróżniła również trzy cele szczegółowe: 1) identyfikację najskuteczniejszych substancji bioaktywnych (prebiotyków, probiotyków i ekstraktów roślinnych) pod względem właściwości ograniczających działanie bakterii *Campylobacter* i *Salmonella*; 2) określenie optymalnej dawki wybranych substancji bioaktywnych, które mają być podane do zarodka kurczęcia oraz 3) przeprowadzenie badania *in vivo* wpływu wybranych substancji na homeostazę jelit i parametry produkcyjne brojlerów, w celu potwierdzenia skuteczności opracowanego protokołu.

Biorąc pod uwagę wyzwania z jakimi współcześnie musi się mierzyć przemysł drobiarski, wybór tematu badań należy uznać za niezwykle aktualny i potrzebny z praktycznego punktu widzenia.

Material i metody

W pierwszym artykule cyklu Autorka zaprezentowała wyniki eksperymentu nr 1 polegającego na doborze odpowiedniej pary prebiotyku i probiotyku tworzącego synbiotyku lub probiotyku i fitobiotyku nazwanej przez Doktorantkę „prophybiotic”. Do testów wybrano sześć probiotyków: *Lactiplantibacillus plantarum* B/00166, *Lacticaseibacillus casei* B/00164, *Limosilactobacillus reuteri* B/00281, *Lacticaseibacillus rhamnosus* B/00279, *Leuconostoc mesenteroides* B/00288 oraz *Pediococcus pentosaceus* B/00165; trzy prebiotyki: rafinozę, inulinę oraz sacharicterpenin; oraz trzy fitobiotyki, będące wyciągami roślinnymi z kurkumy, zielonej herbaty oraz czosnku. Analizowano kinetykę wzrostu poszczególnych szczepów bakterii probiotycznych w obecności prebiotyków lub wyciągów roślinnych.

W drugim artykule Doktorantka przedstawiła wyniki eksperymentu nr 2 polegającego na wybraniu szczepu bakterii probiotycznych wykazujących się największym potencjałem przeciwbakteryjnym w stosunku do czterech szczepów bakteryjnych: *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium (DPC6463), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar

Typhimurium (ATCC 14028), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Braenderup (NRL-IE-22) i *Campylobacter jejuni* DVI-SC181. Zastosowano cztery testy: Spot overlay assay, Well diffusion assay, Co-culture assay oraz Co-aggregation assay.

Artykuł nr 3 zawiera wyniki eksperymentu przeprowadzonego na kurczętach brojlerach Ross 308, w którym porównywano 4 grupy ptaków: 1) nie poddawane iniekcji *in ovo*, 2) otrzymujące jedynie sól fizjologiczną, 3) otrzymujące probiotyk *Leuconostock mesenteroides* B/00288 oraz 4) otrzymujące w/w probiotyk wraz z wyciągiem z czosnku. Ocenianymi parametrami kurcząt były: wylęgowość, masa ciała, długość oraz ocena Pasgara. W 35 dniu poubojowo badano jelita ślepe pod kątem mikrobiomu, ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną oraz obrazu histologicznego. Oceniano również parametry produkcyjne, wartość rzeźną oraz jakość mięsa brojlerów. Ponadto w 7 i 34 dniu pobierano próbki kału w celu oceny mikrobiomu jelitowego na obecność korzystnych oraz potencjalnie szkodliwych szczepów bakteryjnych.

We wszystkich artykułach dane cyfrowe uzyskane z przeprowadzonych eksperymentów były każdorazowo poddawane analizie statystycznej umożliwiającej wykazanie istotności różnic pomiędzy poszczególnymi grupami.

Oceniając ten aspekt dysertacji należy stwierdzić, że zastosowana metodyka jest nowoczesna, adekwatnie dobrana i gwarantująca uzyskanie wiarygodnych wyników naukowych.

Wyniki

Rezultaty uzyskane z eksperymentu nr 1 wskazały, że w skład komplementarnych synbiotyków mogą wejść: sacchariterpenin z *Lactiplantibacillus plantarum* lub *Leuconostoc mesenteroides*, oraz inulina z *Lacticaseibacillus casei*. Natomiast *Lacticaseibacillus rhamnosus* i *Pediococcus pentosaceus* nie były kompatybilne z żadnym z testowanych prebiotyków. Z kolei 0,5% wyciąg z czosnku okazał się być najlepszą opcją do stworzenia profibiotyku. Doceniając zatem korzystne oddziaływanie fitobiotyków na kondycję jelit, Doktorantka słusznie wybrała połączenie probiotyku i fitobiotyku jako najlepsze połączenie do testów *in vivo*.

Wyniki szeregu testów przeprowadzonych w ramach eksperymentu nr 2 wykazały, że najwyższy potencjał przeciwbakteryjny posiada *Leuconostock mesenteroides*, stąd został on wytypowany jako probiotyk wchodzący w skład profibiotyku.

W badaniach *in vivo* kurczęta otrzymujące profibiotyk osiągały bardzo dobre wyniki produkcyjne takie jak wylęgowość, masa ciała po wylęgu oraz w okresie do dwóch tygodni po nim. Ponadto w 7 dniu życia odnotowano w odchodach wzrost względnej liczebności *Bifidobacterium* sp. i *Faecalibacterium* sp. a także redukcję *E. coli* w porównaniu z grupą kontrolną. Badania jelit

ślepych wykazały niejednoznaczny wpływ badanych substancji bioaktywnych na względną liczebności bakterii produkujących krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, polegający na redukcji *Faecalibacterium sp.* przy jednoczesnym wzroście *Akkermansia sp.* W błonie śluzowej tego narządu stwierdzono również wzrost ekspresji genów dla ptasiej beta-defensyny 1 (*AVBD1*), receptora wolnych kwasów tłuszczowych (*FFAR2*) oraz mucyny 6 (*MUC6*). Z kolei badania histomorfometryczne jelit ślepych wykazały zmniejszenie powierzchni kosmków jelitowych, głębokości krypt jelitowych oraz współczynnika wysokości kosmków do głębokości krypt.

Zebrane wyniki we wszystkich artykułach oraz w ich podsumowaniu zostały zaprezentowane czytelnie, a liczne wykresy opatrzone wynikami analiz statystycznych ułatwiają czytelnikowi porównanie poszczególnych grup badawczych.

Dyskusja

W tym rozdziale Autorka skonfrontowała wyniki własnych badań z pracami innych autorów. Prezentowana literatura jest aktualna i właściwie dobrana, co świadczy o dobrym opanowaniu tematyki badawczej. Pod koniec tego rozdziału Doktorantka wykazała ograniczenia związane z zastosowaniem wybranego protokołu. Wskazuje to na dużą dojrzałość naukową polegającą na umiejętności krytycznej oceny uzyskanych wyników badań. W rozdziale podsumowanie, Autorka prezentuje 8 wniosków płynących z przeprowadzonych badań.

Spostrzeżenia i uwagi krytyczne

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę Doktorantce na kilka elementów, które powinny być poprawione:

Na str. 28. IL-2 i IL-4 zostały wymienione jako cytokiny prozapalne, podczas gdy IL-2 jest klasyfikowana jako cytokina regulatorowa (stymuluje odpowiedź Th1), natomiast IL-4 jest cytokiną przeciwzapalną. Należy jednak zaznaczyć, że opis cytokin w artykule nr 3 jest prawidłowy.

W artykule nr 3. Fig. 8. punkt D. Określenie „rozmieszczenie krypt w wiele warstw” uważam za mylące, ponieważ krypty w tym narządzie tworzą jedną warstwę biegnącą prostopadle do ściany narządu, co widać wyraźnie np. na zdjęciu A i B. Natomiast fałszywie „wielowarstwowy” obraz krypt, wynika z przekroju skośnego tych struktur. Następnie w akapicie dotyczącym histologii jelit ślepych autorzy podają, że „wzrost głębokości krypt oraz większa liczba krypt w układzie wielowarstwowym” wskazują na szybszą proliferację komórek nabłonka jelitowego oraz tempo ich różnicowania. Uważam, że jedynie ten pierwszy argument jest słuszny i w pełni wystarczający.

Na str. 53. Doktorantka odnosząc się do brojlerów w wieku do 5 tygodnia życia określa je jako dorosłe, podczas gdy dojrzałość płciową kury typu mięsnego osiągają dopiero ok. 22-25 tygodnia życia.

Doktorantka wprowadza nowy termin „profibiotyk” (w oryginale – prophybiotic) odnoszący się do połączenia probiotyku i fitobiotyku. Samo wprowadzenie nowej nazwy na takie połączenie uważam za zasadne, jednak o ile przedrostek „pro” jednoznacznie wskazuje na probiotyk, o tyle przedrostek „fi” niewiele mówi czytelnikowi. Proponuję, aby zastąpić go przedrostkiem „fito” wskazującym jednoznacznie na pochodzenie roślinne. Nowy termin brzmiałby zatem „profitobiotyk” (ang. prophytobiotic).

Wymienione powyżej niedociągnięcia i uwagi w żaden sposób nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej prezentowanej dysertacji oraz nie zmieniają jej bardzo pozytywnej oceny.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny, powiązany tematycznie i dobrze zredagowany pod względem merytorycznym cykl prac, opublikowany w renomowanych czasopismach naukowych. Przeprowadzone badania wpisują się w zagadnienia opisane w celu głównym oraz celach szczegółowych dysertacji. Prezentowane wyniki eksperymentów i płynące z nich wnioski stanowią cenny materiał zarówno pod względem poznawczym jak i praktycznym.

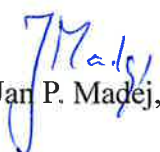
Podsumowując, chciałbym podkreślić, że zakres wykonanych badań jest bardzo szeroki, co wymagało od Doktorantki gruntownego przygotowania merytorycznego oraz dużego nakładu pracy. Tekst dysertacji oraz artykułów jest zredagowany bardzo starannie, a prezentowane badania są przedstawione w sposób komunikatywny i wskazujący na dobrą znajomość tematu. Udział pozostałych współautorów cyklu prac, nie umniejsza indywidualnego znaczącego wkładu pracy Doktorantki, natomiast wskazuje na umiejętność podejmowania międzynarodowej współpracy, co jest szczególnie ważne w realizacji ambitnych projektów.

Wniosek końcowy

Praca doktorska Pani mgr. Rameshy N. Wishna-Kadawarage, pt. „In-ovo stimulation as a tool to improve gut health of broiler chickens”, w mojej ocenie w pełni odpowiada wymogom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.) stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora. Dlatego też składam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny

Zootechnika i Rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, o dopuszczenie mgr. Rameshy N. Wishna-Kadawarage do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na wysokie walory naukowe, zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.


dr hab. Jan P. Madej, prof. uczelni

