

Kraków, 10.01.2020 r.

Dr hab. Dorota Wojtysiak, prof. UR
Katedra Genetyki, Hodowli i Etologii Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. wet. Łukasza Prosta pt. „Prenatalne programowanie przewodu pokarmowego u prosiąt: wpływ suplementacji kwasem 3-hydroksy-3-metylomasłowym (HMB) ciężarnych loch na rozwój jelita czczego i grubego u ich potomstwa”

Praca doktorska Pana lek. wet. Łukasza Prosta została wykonana na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej w Katedrze Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, pod kierunkiem Pani dr hab. n. wet. Ewy Tomaszewskiej prof. uczelni, a także Pana dr hab. Piotra Dobrowolskiego, prof. uczelni jako promotora pomocniczego.

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 12 grudnia 2019 roku.

Programowanie prenatalne jako określenie jest szeroko używane w odniesieniu do zmian o charakterze trwałym w przebiegu procesów fizjologicznych lub metabolicznych okresu płodowego. Wśród mechanizmów uwzględnianych w procesach programowania prenatalnego wymienia się m.in.: nadmierne pobudzenie u płodu osi podwzgórze-prysadka-kora nadnerczy (HPA), zmiany stężenia progesteronu w organizmie matki, czy też działania szkodliwych substancji. Efekty uzyskane w wyniku zmiany programowanego rozwoju prenatalnego polegają na przyspieszeniu lub zahamowaniu rozwoju i dojrzałości somatyczno-hormonalnej organizmu, decydując o stopniu samodzielności w okresie pourodzeniowym. Istotne implikacje procesu programowania prenatalnego, w tym przede wszystkim niska masa urodzeniowa, prowadzą do zwiększonego ryzyka występowania wielu chorób kardiologicznych, metabolicznych i zaburzeń płodności. Coraz większe znaczenie w programowaniu prenatalnym przypisuje się także diecie matki. Nieprawidłowy bilans energetyczny oraz ilość składników odżywczych w całodiennej racji pokarmowej mogą znacząco wpływać na rozwój płodu. Dlatego tak ważne jest właściwie zbilansowane żywienie matek oraz ewentualna suplementacja.

W hipotezie badawczej Doktorant założył, iż podawanie HMB ciężarnym maciorom zwiększa stopień rozwoju jelit u potomstwa w okresie odsadzenia. Podjętą przez Doktoranta problematykę badawczą należy uznać za interesującą i ważną, wpisującą się w zagadnienia, które obejmuje prenatalne programowanie żywieniowe i co z tym związane wszelkie korelacje pomiędzy dietą a rozwojem prenatalnym płodu.

Kwas 3-hydroksy-3-metylomasłowy (HMB) jest metabolitem aminokwasu rozgałęzionego leucyny. Endogenna produkcja HMB w organizmie człowieka i zwierząt zachodzi przede wszystkim w wątrobie oraz mięśniach szkieletowych. Większość prowadzonych dotychczas badań koncentrowała się na ocenie wpływu suplementacji HMB na tempo syntezy i proteolizy białek oraz monitoringu wskaźników biochemicznych, wpływie na metabolizm tkanki tłuszczowej i odporność immunologiczną organizmu. Wykazano również korzystne oddziaływanie HMB m.in. na mineralizację

i wspomaganie metabolizmu tkanki kostnej. Uwagę zwracają także badania, które wykazały, że HMB może być prekursorem syntezy cholesterolu w komórkach mięśniowych. Jest to szczególnie istotne w tkankach, które są uzależnione od syntezy cholesterolu *de novo*. Z kolei w badaniach prowadzonych na ptakach wykazano, że podawanie HMB zwiększa ich przeżywalność, poprawia wartość rzeźną, a także wpływa stymulująco na rozwój układu pokarmowego.

Pomimo tak licznych badań analizujących efekty działania HMB na organizm człowieka jak i zwierząt niewiele wiadomo o wpływie tego związku na organizm w okresie prenatalnym. Stąd też podjęcie badań nad efektami działania HMB w sterowaniu rozwojem układu pokarmowego uważam za uzasadnione tak pod względem poznawczym, jak i aplikacyjnym. Powszechność występowania schorzeń układu pokarmowego i zaburzenia jego funkcjonowania szczególnie w okresie odsadzenia powiązane są z bardzo wysokimi kosztami leczenia i stratami ekonomicznymi w hodowli zwierząt. Tym samym poznanie efektów działania HMB jako potencjalnego czynnika programującego mogą w znacznym stopniu poszerzyć wiedzę dotyczącą fizjologicznych mechanizmów regulujących procesy wzrostu, rozwoju i funkcjonowania przewodu pokarmowego na modelu świni.

Praca doktorska Pana lek. wet. Łukasza Prosta napisana jest w języku polskim, jest rozprawą liczącą 86 stron standardowego wydruku komputerowego formatu A-4. Układ pracy i podział treści jest typowy dla tego typu dysertacji i z formalnego punktu widzenia nie budzi zastrzeżeń. Zawiera: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, a także pięć rozdziałów zatytułowanych jako: Wprowadzenie, Cel i uzasadnienie badań, Materiał i metody, Rezultaty, Dyskusja, a także Wnioski, Wykaz piśmiennictwa, Wykaz rycin, Spis tabel oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Praca napisana jest w sposób zrozumiały i staranny, poprawnym stylistycznie językiem. Tytuł rozprawy odzwierciedla zagadnienia poruszane w opracowaniu.

Na początku dysertacji umieszczono spis skrótów stosowanych w pracy co niewątpliwie ułatwia zapoznanie się z treścią pracy. Umieszczony w dalszej kolejności rozdział „Wprowadzenie” opracowano na 19 stronach maszynopisu. W tej części pracy omówione zostały zagadnienia z zakresu programowania prenatalnego, mechanizmów odpowiedzialnych za zaburzenia procesów fizjologiczno-rozwojowych okresu prenatalnego i procesów adaptacyjnych nowo urodzonego organizmu. Szczególnie dokładnie omówiono budowę jelita cienkiego i grubego, a także dużą uwagę poświęcono zagadnieniom związanym z trawieniem enzymatycznym składników pokarmowych. Doktorant przedstawił także aktualny stan wiedzy dotyczący efektów działania HMB na organizm zarówno człowieka jak i zwierząt.

Takie przedstawienie zagadnień w tym rozdziale uważam za w pełni przemyślane, dojrzałe i dające możliwość właściwego wprowadzenia i zapoznania z podjętą w pracy tematyką badawczą. Obszernie cytowane i dobrze dobrane piśmiennictwo świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnień, których dotyczy oceniana dysertacja doktorska. Doktorant w dużej mierze cytuje najnowsze, najbardziej aktualne piśmiennictwo z tego zakresu. Różnorodność i obszerność opisywanych zagadnień z pewnością ułatwia zrozumienie wyników przeprowadzonych badań.

Z obowiązku recenzenta chciałam zwrócić uwagę na drobne nieścisłości. W rozdziale tym przywołano dwie pozycje piśmiennictwa, których nie ujęto w spisie literatury (str. 8 - Śliwa i wsp. 2006; str. 21 – Nissen i wsp. 1997). Druga uwaga dotyczy zastosowanego w pracy mianownictwa - na stronie 9 (czwarta linijka od dołu) Doktorant używa określenia „świnka morska” a powinno być „kawia domowa”.

Biorąc pod uwagę doniesienia o korzystnych efektach podawania HMB w okresie prenatalnym na rozwój różnych układów, w tym układu szkieletowego oraz mięśni poprzecznie prążkowanych szkieletowych, przy braku satysfakcjonujących danych odnośnie metabolitu leucyny jako czynnika programującego rozwój i funkcję układu pokarmowego, Doktorant postawił sobie ambitny cel oceny wpływu prenatalnego podawania HMB w diecie ciężarnej samicy na rozwój

postnatalny przewodu pokarmowego u świni domowej, ze szczególnym uwzględnieniem jelita czczego i grubego.

Do osiągnięcia zamierzonego celu Doktorant przeanalizował 12 prosiąt (łoszki i knurki) uzyskane od 6. matek otrzymujących dodatek HMB w ilości 0,2 g/kg masy ciała dziennie, od 70. do 90. dnia ciąży i stanowiących grupę doświadczalną oraz 12 prosiąt (łoszki i knurki) uzyskane od 6. matek karmionych paszą bez dodatku HMB stanowiących grupę kontrolną. W 35. dniu życia neonatalnego tj. w momencie zmiany formy żywienia z płynnej na stałą prosięta obu płci poddano eutanazji i pobrano stosowne próby do badań. Badania wykonano za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej w Lublinie. Jedyna moja sugestia w tym zakresie to dołączenie kopii decyzji LKE w formie załącznika do maszynopisu. Wybrany gatunek zwierzęcia eksperymentalnego tj. świnia domowa jest jak najbardziej właściwy z uwagi choćby na możliwość przeniesienia wyników na człowieka. Liczba zwierząt użytych w doświadczeniu jest odpowiednia dla tego typu badań i spełnia wymogi ograniczenia liczby zwierząt używanych w doświadczeniach.

Rozdział „Materiał i metody”, Doktorant przedstawił na 9. stronach maszynopisu. Zredagowano go z dużą dbałością o szczegóły przeprowadzonych eksperymentów. Na szczególną uwagę zasługuje także właściwy dobór okresu suplementacji ciężarnych loch dodatkiem HMB, tj. okres między 70. a 90. dniem ciąży, który dla świni domowej jest okresem najbardziej wrażliwym. W dalszej części Autor przedstawił metody przeprowadzonych badań. W sposób przejrzysty przedstawiono metodologię analiz histomorfometrycznych, immunohistochemicznych, a także analiz dotyczących oceny liczby krwinek czerwonych i białych w krwi obwodowej oraz analiz surowicy krwi prosiąt. Doświadczenia przeprowadzono zgodnie z obowiązującymi zasadami prowadzenia tego typu badań na zwierzętach a uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej przy zastosowaniu adekwatnych testów. Z obowiązku recenzenta nie mogę nie zwrócić uwagi na pewne elementy metodyki, których w moim odczuciu brakowało w tym rozdziale. Mam tutaj kilka pytań:

- Z którego w kolejności miotu pochodziły prosięta?

- Jakie były kryteria wyboru prosiąt do doświadczenia? Czy sugerowano się średnią masą ciała prosiąt w obrębie miotu i płci?

Z uwagi na fakt, że masa ciała prosiąt w dniu urodzenia jest podstawowym czynnikiem determinującym wyniki odchowu do odsadzenia, a także późniejszą użytkowość tuczną, rzeźną oraz przydatność rozplodową bardzo istotne jest przedstawienie wszystkich czynników, które mogą wpływać na tę cechę, a więc wieku loch, liczby prosiąt urodzonych w miocie, a także informacji o ojcu /ojcach prosiąt.

Inne drobne uwagi to:

- Strona 28, rozdział III.2.3.5. – Doktorant powołuje się na metodę szacowania powierzchni wchłaniania jelita cienkiego opracowaną przez Kisielińskiego i współpracowników jednak nie podaje dokładnej bibliografii. Jest to oczywiście uchybienie marginalne, ale jednak warto podawać takie dane choćby z uwagi na powtarzalność badań.

- Proponuje także wyodrębnienie podrozdziału III.3.2. jako osobny rozdział, gdyż zgodnie z tytułem rozdziału III.3. „Badanie surowicy krwi prosiąt”, ocena liczby krwinek czerwonych i białych analizowana w podrozdziale III.3.2. nie mieści się w tematyce rozdziału III.3.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej części dysertacji. Pragnę natomiast w tym miejscu szczególnie podkreślić szeroki zakres prowadzonych oznaczeń i pomiarów oraz analiz co zasługuje na duże uznanie.

Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione i udokumentowane bardzo rzetelnie w formie 8 tabel i 10 rycin oraz w formie zwartego komentarza słownego na 18. stronach maszynopisu w rozdziale „Rezultaty”. Zawarte tu dane są w pełni zgodne z założoną hipotezą badawczą, materiałem i metodami przyjętymi w niniejszej dysertacji doktorskiej. Doktorant dokonał ich prawidłowej i wyczerpującej oceny. Przedstawione wyniki są ciekawe i jednocześnie inspirują do dalszych badań.

Mają także swoją wartość poznawczą i wartość praktyczną. Na pochwałę zasługuje forma prezentowania wyników. Tabele i ryciny są przejrzyste i czytelne, zredagowane z dużą starannością. Do tej części dysertacji mam tylko kilka drobnych uwag:

- W rozdziale „Materiał i metody” podana jest informacja cyt. „Wszystkie prosięta w miocie w momencie narodzin były ważone ...” – takiej informacji nie znalazłam w rozdziale „Rezultaty”. Druga uwaga dotyczy zamieszczonych w dysertacji tabel. I tak, tytuły tabel nie zamyka się kropką. Ponadto, Doktorant prezentując dane liczbowe w tabelach stosuje zapis „średnia $\pm$ SD”. Zapis ten jest bardzo popularny w pracach naukowych. Jednak należy pamiętać, że średnia arytmetyczna jest miarą położenia, zaś odchylenie standardowe jest miarą zmienności. Mierzą one zupełnie inne cechy próby i nie należy ich łączyć znakiem „ $\pm$ ”. Proponuję wprowadzić osobne kolumny dla średniej a osobne dla SD.

Rozdział „Dyskusja”, liczący 16 stron maszynopisu, oparty jest na rozległej znajomości podjętej tematyki badawczej. Logiczność prowadzonych wywodów nie budzi żadnych zastrzeżeń. Dyskusja jest merytoryczna, konkretna, logicznie przeprowadzona i dobrze udokumentowana cytowanymi źródłami. O aktualności zagadnień poruszanych w dyskusji świadczy również fakt, że większość cytowanych publikacji ukazało się po 2010 roku.

Ważnym rozdziałem wieńczącym pracę są „Wnioski”. Autor sprecyzował je w 5. punktach i są one podsumowaniem kolejnych etapów badań. Ich treść jest uzasadniona wynikami badań i w pełni odpowiada na postawione w celu dysertacji pytania.

Zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej zostały poparte liczным i właściwie dobranym piśmiennictwem świadczącym o dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktoranta. Rozdział „Piśmiennictwo” liczy 12 stron i zawiera 111 pozycji literatury, z czego przeważająca większość to prace i artykuły aktualne z ostatnich 10 lat, przy czym trzy pozycje literatury nie zostały zacytowane w tekście pracy.

- Engle M. J., Kemniz J. W., Yao T. J., Perelman R. H., Farell P. M.: Effects of maternal dexamethasone therapy on fetal lung development in the rhesus monkey. *Am J Perinat.* 1996, 13, 399-407.

- Śliwa E.: Effect of simultaneous versus apart administration of dexamethasone and alpha-ketoglutarate on growth hormone, cortisol and insulin-like growth factor-I in pigs. *Bull Vet Inst Pulawy* 2006, 50, 205-210.

- Taszkun I., Moniuszko S.: Nowe zasady postępowania leczniczego w atopowym zapaleniu skóry psów. *Cz. I. Mag Wet.* 2012, 21, 5-11.

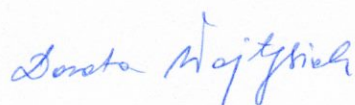
Praca zakończona jest dobrze opracowanym streszczeniem w języku polskim i angielskim.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że osiągnięcie badawcze Doktoranta oceniam wysoko, zarówno ze względu na bardzo szeroki i nowatorski zakres badań, zastosowane metody, jak i znaczącą wartość wyników pracy dla nauki, ale także potencjalnie dla praktyki, gdyż mogą zostać wykorzystane w diagnostyce zaburzeń rozwojowych okresu prenatalnego. Moim zdaniem badania, które przeprowadził Pan lek. wet. Łukasz Prost są bardzo inspirujące i znacząco poszerzają wiedzę z zakresu mechanizmów regulujących procesy programowania prenatalnego.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę celowość i aktualność podjętych badań, zakres ich realizacji, formę prezentacji oraz interpretację uzyskanych wyników stwierdzam, że wnoszą one nowe wartości poznawcze i mogą mieć ważny aspekt praktyczny. Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi i spostrzeżenia mają charakter pomocniczy, nie umniejszają wartości merytorycznej pracy i nie mają większego wpływu na ostateczną jej ocenę. Wobec tego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana lek. wet. Łukasza Prosta spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim

określone w ustawie z dnia 14.03.2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1383) w zw. z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. oraz przepisów wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. poz. 1383). W związku z tym przedkładam Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana lek. wet. Łukasza Prosta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Dorota Wojtysiak, prof. UR