

## **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej lek. wet. Łukasza Prosta pt.:**

***Prenatalne programowanie przewodu pokarmowego u prosiąt: wpływ suplementacji kwasem 3-hydrokso-3-metylomastłowym (HMB) ciężarnych loch na rozwój jelita czczego i grubego u ich potomstwa.***

*Recenzję opracowano zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria,  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 12 grudnia 2019 r.*

Problematyka programowanego rozwoju organów narządów, ich struktury i funkcji u potomstwa poprzez odpowiednio zmodyfikowane żywienie matek w okresie prenatalnym, cieszy się niesłabnącym i wciąż rosnącym zainteresowaniem środowiska naukowego. Dotyczy to zarówno medycyny ludzkiej, jak i medycyny weterynaryjnej. Obecnie National Center for Biotechnology Information a dokładnie PubMed indeksuje około 1700 prac zawierających słowa kluczowe „*fetal programming*”, z czego prawie połowę napisano w okresie ostatnich pięciu lat. Niezwykle istotne w tym szczególnym kierunku badawczym jest to, że modele opracowane na zwierzętach mogą w wielu wypadkach pomóc w zrozumieniu podobnych lub tych samych mechanizmów u człowieka. Stąd w przypadku krajów wysokorozwiniętych liczba grantów zawierających słowo kluczowe „*fetal programming*” nieprzerwanie rośnie. W USA liczba grantów zawierających wymienione wyżej słowa kluczowe, przyznanych przez National Institute of Health wzrosła z 72 w roku 1985 do 347 w roku 2019.

Biorąc pod uwagę powyższe, wybór tematyki rozprawy doktorskiej polegający na analizie prenatalnego programowania przewodu pokarmowego u prosiąt oraz analizę wpływu suplementacji kwasem 3-hydrokso-3-metylomastłowym (HMB) ciężarnych loch na rozwój

---

jelita czczego i grubego u ich potomstwa jest w pełni uzasadniony. Podjęte zadania badawcze są aktualne mają również niepodważalny potencjał aplikacyjny.

Oceniana rozprawa ma 86 stron maszynopisu. Dysertacja ma klasyczny układ w którym, w kolejności można wyróżnić stronę tytułową zawierającą tytuł rozprawy w języku polskim, podziękowania, spis treści, wykaz skrótów, wprowadzenie, cel pracy, materiały i metody, rezultaty, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, wykaz rycin, spis tabel, streszczenie w języku polskim oraz angielskim.

Spis treści informuje o kolejności wszystkich elementów rozprawy. W wykazie stosowanych skrótów autor wyjaśnił większość skrótów stosowanych w dysertacji. Pominięto w nim skrót taki jak RBC, WBC czy CD3.

Wprowadzenie stanowi obszerny fragment rozprawy. Rozległy wstęp odzwierciedla szerokie spojrzenie autora na poruszaną w rozprawie problematykę. Wstęp w obecnej formie pozwala na właściwe zrozumienie złożonej tematyki przedstawionej w rozprawie. W podrozdziale zatytułowanym „Prenatalne programowanie” przedstawiono znane obecnie mechanizmy warunkujące wystąpienie zarówno korzystnych jak i niekorzystnych efektów wynikających z wpływu na rozwój potomstwa w wyniku ingerencji, w specyficzne dla tych efektów okienka rozwojowe. Cennym podsumowaniem podrozdziału byłoby krótkie tabelaryczne zestawienie pozytywnych oraz negatywnych efektów obserwowanych w wyniku wpływu określonego czynnika na płód.

Kolejny podrozdział „Przewód pokarmowy świni” ma konwencję nieco podręcznikową, dwie pierwsze strony podrozdziału pozbawione są jakichkolwiek odniesień literaturowych. Podrozdział doskonale wprowadza w temat związany ze specyfiką przewodu pokarmowego świni jednak chwilami zdaje się odbiegać od głównego nurtu rozprawy. Kontekst tej części rozprawy z pewnością wzmocniłaby większa liczba odniesień do programowania prenatalnego i wątków poruszonych wcześniej.

W podrozdziale zatytułowanym „Kwas 3 hydrokso-3-metylomasłowy (HMB)” autor w interesujący sposób wprowadza w zagadnienia związane z obecnym stanem wiedzy na temat wpływu HMB na fizjologię zwierząt domowych oraz człowieka. Tekst rozdziału prowokuje do stawiania hipotez. W przekonujący sposób uwydatnia potencjał HMB jako czynnika modyfikującego wzrost i rozwój w trakcie stosowania w tzw. okienkach rozwojowych.

W tekście wstępu Autor nie przywołuje żadnych rycin schematów czy tabel.

W rozdziale „Cel i uzasadnienie badań”. Doktorant w zwarty i przejrzysty sposób przedstawił cel prowadzonych badań. Jego brzmienie „*hipoteza o możliwości zwiększenia stopnia rozwoju jelit (...)*” nie jest do końca równoważne tytułowi rozprawy „*wpływ*

---

*suplementacji kwasem 3-hydrokso-3-metylomastlowym (HMB) ciężarnych loch na rozwój jelita czczego i grubego u ich potomstwa*". W przypadku ocenianej dysertacji jej tytuł precyzyjnie odzwierciedla również cel w związku z czym nie było potrzeby modyfikowania tego zapisu. Część uzasadnienia prowadzonych badań znajduje się pod koniec wstępu w podrozdziale dotyczącym HMB. Analiza potencjału HMB oraz obecnego stanu wiedzy na temat programowania prenatalnego pozwoliła na sprecyzowanie celu prowadzonych badań. Doktorant we wstępie oraz jasno wyrażonych celach w pełni wyjaśnił dlaczego podjął tematykę badawczą prezentowaną w dysertacji.

W materiałach i metodach opisano schemat „doświadczenia”, jakości prezentowanego tekstu dodałoby raczej stwierdzenie o prowadzeniu badań niż doświadczenia. Opis warunków hodowlanych oraz rodzaju stosowanych pasz jest zbyt ogólny i powinien zawierać wszystkie niezbędne szczegóły. Nie podano również dawki pentobarbitalu użytego do uśmiercenia zwierząt. W pracy przedstawiono informację o tym że „zdrowe i pozbawione wad wrodzonych prosięta (n=24) przebywały w standardowych warunkach ...”. Z opisu nie wynika jednak ile prosiąt od loch kontrolnych oraz ile prosiąt od loch z grupy doświadczalnej spełniło kryteria włączenia, jakie były te kryteria oraz ile prosiąt uśmiercono. Nie jest również jasne ile prosiąt określonej płci znajdowało się w poszczególnych grupach.

W kolejnych podrozdziałach materiałów i metod, opisano sposób w jaki przygotowano materiał do dalszych analiz, opisano sposób barwienia i rejestracji obrazów, również kolejne kroki analizy histomorfometrycznej. W rozdziale III.2 nie przywołano żadnej pozycji piśmiennictwa. W opisie poświęconym identyfikacji limfocytów T oraz T0 brakuje doprecyzowania które dokładnie subpopulacje limfocytów analizowano (antygen różnicowania komórkowego CD). Można o tym wnioskować jedynie po nazwie zastosowanych materiałów. Autor przeprowadził analizy jedynie dwóch typów komórek krwi, białych i czerwonych. Jednak analizator opisany w metodyce rozprawy jednocześnie podaje wartości dla około 24 różnych parametrów krwi pełnej. Również w kontekście tego elementu rozprawy nie jest jasne do czego służyła pobrana wcześniej surowica krwi oraz w jaki sposób pozyskano matrycę do oznaczenia poziomu limfocytów CD3+. W sekcji „Ocena statystyczna wyników” brakuje informacji o tym, jakiego rodzaju średnią przedstawiono (arytmetyczna/geometryczna).

W sekcji „Rezultaty” Doktorant przedstawił wyniki przeprowadzonych badań. Wyniki przedstawiono w 8 zwartych i przejrzystych tabelach. Niektóre określenia wymagają korekty jak np. „... ekspresja leptyny była słabsza ...” zamiast niższa lub na niższym poziomie. Mimo drobnych niedociągnięć tabele we właściwy sposób relacjonują uzyskane rezultaty. Na kolejnych stronach przedstawiono 10 rycin ilustrujących wyniki analiz

---

immunohistochemicznych. Niestety pojedyncze zdjęcia pokrywają najczęściej tylko ¼ strony, w związku tym wiele szczegółów uwidoczonych na zdjęciach trudno dostrzec. Na rycinie 4 pozostawiono ramkę edycji obiektu pole tekstowe. Podsumowując sposób prezentacji oraz zakres tej części rozprawy we właściwy sposób dokumentuje przeprowadzone badania.

Dyskusja zajmuje znaczny fragment rozprawy. Autor dyskutuje w niej obecny stan wiedzy dotyczący programowania prenatalnego. W niektórych fragmentach brakło jednak informacji źródłowych dotyczących piśmiennictwa. W zdaniu „Jak dowodzą liczne badania z procesami wzrostu i rozwoju w obrębie tkanek i narządów związane jest także zjawisko apoptozy.” Autor nie przytacza żadnej pozycji wymienionych w zdaniu licznych badań. Podobnie w zdaniu „Istnieją doniesienia naukowe ...” nie podano informacji na jakie doniesienia powołuje się Autor. W dyskusji a także we wstępie brakuje odniesień do pracy chińskich autorów z roku 2017 pt. „*Fetal and neonatal programming of postnatal growth and feed efficiency in swine*”. Opublikowanych w *Journal of Animal Science and Biotechnology* (DOI: 10.1186/s40104-017-0173-5).

W dyskusji zwraca uwagę swobodny dojrzały styl w jakim Doktorant prezentuje zebraną wiedzę. Nieliczne potknięcia np.: „... masa ciała loch była statystycznie większa ...” zamiast istotnie większa w niczym nie umniejszają jakości tego elementu rozprawy. Stawiane hipotezy, wyjaśnienia dotyczące poszczególnych efektów zaobserwowanych w trakcie prowadzonych badań przytoczono z zachowaniem dbałości o szczegóły w sposób zwięzły z użyciem fachowego języka. Taka forma przekazu zachęca do czytania, przekonuje i ułatwia analizę problemu.

Na stronie 68 dysertacji Autor przedstawił pięć wniosków z przeprowadzonych badań. Zaprezentowane wnioski szczegółowe w pełni korespondują z postawionymi w rozprawie celami.

Przytoczone piśmiennictwo zawiera 111 pozycji, należy przy tym zauważyć, że prawie 30% z przytoczonych prac oryginalnych powstało w ostatnich 10 latach co potwierdza aktualność diskutowanych w rozprawie zagadnień.

Wykaz rycin oraz spis tabel zawierają wszystkie istotne szczegóły.

Rozdział zatytułowany „*Streszczenie w języku polskim*” w detaliczny oraz syntetyczny sposób opisuje kluczowe elementy rozprawy.

Streszczenie w języku angielskim jest wiernym tłumaczeniem tekstu polskiego. W pierwszym zdaniu streszczenia w języku angielskim zamiast „*gastrointestinal tract*” pojawia się „*gastrointestinal track*”.

---

Podsumowując, oceniana rozprawa to kolejny element dociekań, dotyczących programowania prenatalnego, rozwijany pod opieką promotora: Pani Profesor Ewy Tomaszewskiej. Projekt można uznać za odważny, ponieważ pozbawiony był badań pilotowych. W takich wypadkach zaplanowane prace nie zawsze spełniają oczekiwania badacza. W ocenianej rozprawie w przypadku wielu elementów przeprowadzonych badań nie zauważono istotnych trendów, różnic czy efektów. Jest to niezwykle cenna część rozprawy, ponieważ rozszerza wiedzę na temat HMB i ułatwia planowanie kolejnych badań nie tylko w zakresie w którym potwierdzono istotność różnic pomiędzy grupami. Dysertacja odkrywa nowe fragmenty wiedzy przydatne nie tylko w medycynie weterynaryjnej. Oceniana praca stanowi niezwykle inspirujący materiał i skłania do postawienia pytań Autorowi:

1. W pracy dokonano typowej analizy statystycznej polegającej na analizie istotności różnic pomiędzy grupami. Analiza tego typu nie jest równoznaczna z oceną miary obserwowanego efektu. Jakie miary efektu „*effect size*” zaproponowałby Pan w kolejnych badaniach poświęconych tej tematyce. Czy wymagałyby zmian w schemacie badania.
2. Jak międzyosobnicza zmienność dostępności biologicznej HMB po podaniu *per os* mogła wpłynąć na zmienność uzyskanych wyników. W jaki sposób należałoby znormalizować uzyskane wyniki wartością dostępności biologicznej HMB.
3. Czy różnice w składzie mleka macior którym podawano HMB mogą stanowić cechy współzależne do obserwowanych w pracy efektów.
4. Jak należałoby zoptymalizować prezentowany model aby mieć pewność że podana dawka HMB gwarantuje efekty na poziomie równym  $E_{max}$ .

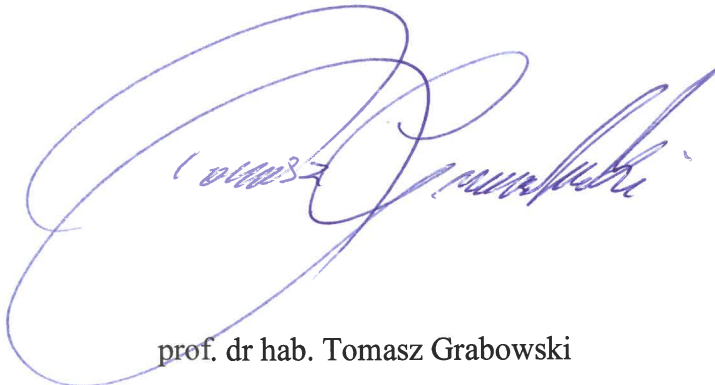


---

Przytoczone wyżej uwagi, głównie natury porządkującej lub redakcyjnej, nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy. Dlatego uważam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska, **lek. wet. Łukasza Prosta** pod tytułem: ***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,*** w pełni odpowiada warunkom określonym w:

- Artykule 13 ustęp 1, Ustawy o stopniach 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.),
- Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. poz. 1383),
- Ustawie z dnia 3 lipca 2018 (art. 179) Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. u. z 30 sierpnia 2018 poz. 1669).

Biorąc powyższe pod uwagę, przedkładam Radzie Dyscypliny Weterynaria, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wnioski o dopuszczenie lek. wet. Łukasza Prosta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Tomasz Grabowski