

dr hab. Lucjan Witkowski, prof. SGGW
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
SGGW w Warszawie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. wet. Michał Metyk

pod tytułem

„Wpływ treningu na stężenie homocysteiny i równowagę prooksydacyjno-oksydacyjną u koni skokowych”

Przedstawiona do recenzji praca powstała w Zakładzie Chorób Wewnętrznych Zwierząt Gospodarskich i Koni Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod opieką promotora dr. hab. Marcina Gołyńskiego, profesora UMK w Toruniu.

Niniejsza recenzja została wykonana na podstawie Uchwały Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 30.06.2022.

Rozprawa doktorska lek. wet. Michała Metyka jest poświęcona ocenie stężenia homocysteiny oraz określeniu relacji pomiędzy homocysteiną a wskaźnikami równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej u koni skokowych podczas treningu o różnym nasileniu. Jako hipotezę badawczą przyjęto, że pomiar stężenia homocysteiny we krwi koni skokowych może być pomocny w ocenie stopnia ich wytrenowania.

Wiadomo, że homocysteina bierze udział w procesie proliferacji limfocytów, komórek śródbłonna i mięśni gładkich, a przez to wpływa na funkcje oraz strukturę układu sercowo-naczyniowego. Jednak wykorzystanie homocysteiny jako biomarkera chorób u ludzi i zwierząt jest zgodnie z aktualną wiedzą praktycznie niemożliwe, nie tylko ze względu na znaczne różnice międzygatunkowe, ale także przez brak badań z tego zakresu.

Dlatego wiedza na temat roli homocysteiny w patogenezie chorób u koni jest ograniczona. Dotychczas nie zostały nawet ustalone normy stężenia tego aminokwasu we krwi u tego gatunku. Istnieją jednak przesłanki literaturowe wskazujące na przydatność oceny tego parametru u koni jako potencjalnego markera chorób.

Omawiana rozprawa doktorska ma tradycyjną formę manuskryptu z typowym dla tego typu prac układem rozdziałów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że praca została bardzo dobrze napisana pod względem językowym. Wstęp opierający się na właściwie i logicznie dobranym piśmiennictwie zawiera informacje na temat roli homocysteiny i stresu oksydacyjnego, ich roli

w patogenezie wybranych chorób człowieka i zwierząt, w tym koni, z uwzględnieniem aspektu wysiłku fizycznego. Wstęp zawiera także informacje dotyczące zastosowania pomiaru chemiluminescencji w ocenie metabolizmu tlenowego u koni.

W mojej opinii brakuje we wstępie aktualnych danych na temat fizjologii wysiłku u konia. W szczególności przydatności badań wysiłkowych i oznaczania stężeń poszczególnych wskaźników we krwi koni wyścigowych i sportowych, w tym różnic w ich interpretacji pomiędzy końmi trenowanymi do różnych konkurencji. Zwłaszcza, że parametry jak kwas mlekowy czy kinaza kreatynowa były oznaczane w ocenianej pracy. Część z tych informacji jest za to zawarta w dyskusji.

Celem pracy była ocena stężenia homocysteiny we krwi oraz próba określenia relacji pomiędzy homocysteiną a wskaźnikami równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej u koni podczas treningu skokowego o różnym nasileniu. Przyjęte zostało założenie, że pomiar stężenia homocysteiny we krwi może być pomocny w ocenie stopnia wytrenowania koni skokowych.

Badania zostały wykonane na 22 koniach rasy polski koń sportowy, trenowanych do skoków, różnej płci, w różnym wieku i stopniu wytrenowania. Zwierzęta znajdowały się w kilku ośrodkach, ale były utrzymywane i karmione w podobny sposób. Zwierzęta podzielono na trzy grupy ze względu na stopień wytrenowania, co w naturalny sposób ma przełożenie na wiek koni. Sposób zakwalifikowania i wykluczenia zwierząt z badań był właściwy.

Doktorant dokładnie opisał schemat treningu dla poszczególnych grup. Długość trwania i intensywność treningu dostosowane do stopnia wytrenowania koni znacznie się różniły.

W opisie grupy trzeciej znajdują się błędy literowe. Drobną pomyłką jest wymienienie 8 zwierząt w grupie liczącej łącznie 7 koni. Natomiast wątpliwości budzi opis fazy intensywnego wysiłku dla tej grupy. Czterdzieści skoków przez przeszkody o wysokości 140 cm, w czasie 20 minut jest praktycznie niemożliwe do wykonania. Oznacza to skok, co około 30 sekund. Prawdopodobnie jest to omyłka pisarska i było to 20 skoków w 20 lub 40 minut. Ponadto brakuje tutaj informacji o tym, w jaki sposób były ustawione przeszkody. Czy był to parkur zmuszający konie do zmiany kierunku ruchu i najazdów na przeszkody, a przez to generujący większy wysiłek, czy kilka przeszkód ustawionych np. dokoła ujeżdżalni?

W moim odczuciu w rozdziale materiały i metody przydatna była by tabela zawierająca zbiorcze dane wszystkich koni biorących udział w badaniu.

Metody zostały dobrane właściwie. Stężenie homocysteiny oznaczano immunochemicznie, w zautomatyzowany sposób za pomocą komercyjnego zestawu do ilościowego pomiaru tego parametru. Jest to metoda używana w medycynie ludzkiej, a także w weterynarii. Do oceny aktywności wolnorodnikowej granulocytów obojętnochłonnych użyta została sprawdzona metoda jaką jest chemiluminescencja krwi pełnej. Szkoda, że Doktorant nie wykorzystał okazji i nie wykonał jednocześnie oznaczeń za pomocą testu czynnościowego oceniającego wybuch tlenowy wykonywanego jako analiza cytometryczna, tzw. BurstTestu czy oznaczeń np. z użyciem zestawu CellROX. Byłoby to dodatkowym atutem pracy oraz ułatwiło porównanie wyników z publikacjami innych autorów. Całkowity status oksydacyjny, stężenie tyroksyny, parametry morfologiczne i biochemiczne krwi zbadano z użyciem komercyjnych zestawów i urządzeń.

Badanie kliniczne wykonywano przed i bezpośrednio po treningu. Dokładny pomiar tętna tuż po zakończeniu treningu u części koni jest utrudniony lub wręcz niemożliwy. Wymaga czasem uspokojenia się zwierzęcia, a przez to ma wpływ na uzyskiwane wyniki. Bardziej

zasadne do oceny tętna byłoby zastosowanie monitora pracy serca i pomiar tętna maksymalnego w czasie treningu. Jednak zastosowany przez Doktoranta pięciokrotny pomiar liczby oddechów i tętna oraz odrzucenie wartości skrajnych należy uznać za właściwy sposób badania w sytuacji braku urządzeń elektronicznych.

Natomiast trzykrotne pobranie materiału do badań (krwi pełnej) przed treningiem, bezpośrednio po oraz po 30 minutowym odpoczynku powinno zostać uzupełniony o kolejne, czwarte pobranie krwi około czterech godzin po treningu. Jest to konieczne do pełnej oceny zmian aktywności kinazy kreatynowej (CK), jednego z podstawowych parametrów używanego w badaniach wysiłkowych.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z zastosowaniem odpowiednich testów.

Pewne zastrzeżenia w mojej opinii budzi sposób prezentacji danych. Na wszystkich wykresach brakuje oznaczeń istotności statystycznej, co utrudnia odbiór i interpretację wyników. Natomiast wykresy przedstawiające dane za pomocą mediany i zakresu powinny zawierać wyniki wszystkich trzech grup dla każdego z prezentowanych parametrów, a nie tylko te, które różnią się statystycznie. Przekładowo ryciny 3 i 4 powinny być połączone, podobnie jak 6 i 7 oraz kolejne.

W analizie statystycznej wyników uzyskanych w analizie chemiluminescencji krwi pełnej po stymulacji opsonizowanym zymosanem obliczono odsetek zwierząt reagujących dodatnio na stymulację. Jest to jeden ze sposobów prezentacji wyników, zwłaszcza w przypadku wskaźników na których wartość ogromny wpływ mają różnice pomiędzy osobnikami, jak ma to miejsce w badaniach wysiłkowych u koni. Jednak, by możliwe było wykazanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami z zastosowanie tego sposobu, to wielkość grup powinna wynosić minimum 20-30 osobników. W przypadku grup mniejszych, a zwłaszcza liczących po 7-8 zwierząt, jak w przeprowadzonych badaniach analiza statystyczna jest bezcelowa, ponieważ moc testu będzie zerowa. Dlatego wnioski wyciągnięte z analizy tych danych w rozdziale 8.2, ich omówienie w dyskusji na stronach 58-59 oraz wniosek czwarty nie mają uzasadnienia w otrzymanych wynikach.

Sposób przedstawienia wyników oznaczeń parametrów hematologicznych jest niespójny. Rozdziały 11.5 i 11.6 przedstawiają wyniki analizy odsetka neutrofilów i limfocytów, a powinny zostać podane jako liczby bezwzględne, z ewentualnym dodaniem odsetka jako informacji uzupełniającej. Podobnie powinny zostać przedstawione dane w tabeli 6, która przedstawia parametry hematologiczne z podaniem liczb, za wyjątkiem neutrofilów i limfocytów podanych jako odsetek.

W przeprowadzonych badaniach stężenie kinazy kreatynowej wzrosło po wysiłku u koni we wszystkich grupach, w tym u koni w grupie pierwszej ponad dwukrotnie. Nie stwierdzono jednak wzrostu istotnego statystycznie. Prawdopodobnie wynika to z przyjętej metodyki badań i pobrania krwi jedynie 30 minut po treningu, podczas gdy stężenie kinazy kreatynowej wyraźnie rośnie do 2-4 godzin po zakończeniu wysiłku. Wskazane byłoby omówienie tego aspektu w dyskusji.

Najwięcej moich wątpliwości budzą wnioski. Tylko wniosek 2 i 6 nie wymagają korekty. Sposób sformułowania wniosku pierwszego może sugerować, że podane wartości są swoistą normą stężenia całkowitej homocysteiny w surowicy koni. Wniosek trzeci nie ma uzasadnienia w uzyskanych wynikach, ponieważ nie badano mechanizmów regulujących powysiłkowe stężenie homocysteiny. Podobnie wniosek piąty zawiera sformułowanie

wynikające z wiedzy ogólnej, a nie uzyskanych wyników. Nie wykazano także istotnego statystycznie wzrostu odsetka koni skokowych na działanie reaktywnych form tlenu, co wynika z treści wniosku czwartego.

Oceniając przedstawioną rozprawę doktorską należy stwierdzić, że stanowi ona wynik właściwie zaplanowanych i przeprowadzonych badań. Wybrany temat pracy jest ciekawy i ważny z poznawczego punktu widzenia. Należy podkreślić, że przeprowadzone badania, oparte o skąpe przesłanki literaturowe, jako typowe badania podstawowe miały na celu przede wszystkim zdobycie nowej wiedzy z zakresu fizjologii wysiłku u koni. Mimo tego, założono także aplikacyjne zastosowanie uzyskanych wyników, z doбором metod laboratoryjnych ewentualnie pozwalających na bezpośrednie zastosowanie uzyskanych wyników badań w praktyce. Podjęcie takiego wyzwania świadczy o odwadze naukowej Doktoranta i gotowości do podejmowania wyzwań.

Zawarte w recenzji uwagi nie mają wpływu na końcową ocenę przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Sugeruję jednak, by je uwzględnić przy publikacji wyników.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i art. 179 ust. 3 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669). W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie pana lek. wet. Michała Metyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lucjan Witkowski

