

Dr hab. inż. Joanna Zeyland
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Pauliny Szczurek

pt. „Metabolizm lipidów i jego rola w regulacji rozwoju przewodu pokarmowego u prosiąt”

Rozprawa doktorska została zrealizowana w Zakładzie Fizjologii Żywienia Instytutu Zootechniki - Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie pod kierunkiem dr hab. Marka Pieszki, prof. nadzw. oraz dr hab. Jarosława Wolińskiego, prof. nadzw. Część badań została wykonana w ramach współpracy pomiędzy Instytutem Zootechniki PIB a *Lund University* w Szwecji. Podstawę formalną niniejszej recenzji stanowi pismo pana dr hab. Piotra Wójcika, prof. IZ, Zastępcy Dyrektora ds. Nauki z dnia 19. lutego 2019 roku (RN/I/7/19) z prośbą o jej wykonanie, zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego podjętą na 210. posiedzeniu, 22 listopada 2018 roku.

Najnowsze szacunkowe informacje dotyczące przyczyn zgonów ludzi w Unii Europejskiej są dostępne za rok 2015. Zdecydowanie najczęstszymi przyczynami zgonu w UE są choroby układu krążenia i choroby nowotworowe. Na podstawie badań naukowych dotyczących znaczenia żywienia i stylu życia w etiopatogenezie nowotworów i chorób układu krążenia, rola otyłości wysunęła się na jedno z pierwszych miejsc w rankingu czynników ryzyka. Do czynników ryzyka związanych z dietą zaliczono: nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemię, wysoki wskaźnik masy ciała (BMI), nadużywanie alkoholu oraz zbyt mały udział owoców i warzyw w żywieniu. Świadomość, że dieta jest jedną z najistotniejszych determinant występowania szeregu zaburzeń metabolicznych stanowiących podłoże rozwoju wielu chorób, zmusza konsumentów do modyfikacji składu produktów spożywczych w kierunku zwiększenia w diecie udziału związków korzystnie wpływających na funkcjonowanie organizmu.

Jedną z ważniejszych przyczyn ograniczania spożycia mięsa i przetworów mięsnych jest duża zawartość tłuszczów, będących istotnym źródłem cholesterolu oraz nasyconych kwasów tłuszczowych. Zależność pomiędzy spożywaniem mięsa (przetworzonego i/lub czerwonego), a występowaniem nowotworów, stwierdzono dla nowotworów jelita grubego, trzustki, żołądka oraz prostaty. Powszechność konsumpcji mięsnych produktów stała się bodźcem do podjęcia działań w kierunku modyfikacji

składu, wartości odżywczych i poprawy ich jakości żywieniowej. Jednym z elementów prawidłowego żywienia zwierząt jest prawidłowy dobór składników odżywczych i substancji bioaktywnych na poszczególnych etapach rozwoju organizmu. Aktualne zalecenia dotyczące zawartości tłuszczów w żywieniu wcześniaków, jak i odsadzonych prosiąt są niejednoznaczne i wydają się niedostosowane do wysokich potrzeb fizjologicznych rozwijających się zwierząt. W związku z powyższym nie ma wątpliwości, że praca mgr inż. Pauliny Szczurek obejmująca badania dotyczące metabolizmu lipidów wpisuje się w aktualny nurt dotyczący żywności i prawidłowego żywienia. Stworzenie zwierzęcego modelu rozwoju przewodu pokarmowego oraz absorpcji kwasów tłuszczowych, pozwala ekstrapolować wyniki i wykorzystać w żywieniu człowieka, rozszerzając tym samym aplikacyjny charakter przedstawionej do oceny pracy.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma typowy układ powszechnie stosowany w pracach doświadczalnych. Zawiera 170 numerowych stron wydruku komputerowego z podziałem na 12 rozdziałów, w tym: wstęp obejmujący wprowadzenie literaturowe, założenia i cel pracy, hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i stwierdzenia, spisy tabel, wykresów i fotografii, streszczenia w dwóch językach oraz piśmiennictwo.

Wprowadzenie literaturowe koncentruje się na dwóch głównych zagadnieniach: rozwoju przewodu pokarmowego prosiąt oraz charakterystyce i roli tłuszczowców w organizmie. Doktorantka szczegółowo opisuje zmiany w budowie przewodu pokarmowego na poszczególnych etapach rozwoju, od okresu prenatalnego poprzez postnatalny do okresu poodsadzeniowego. Ta część pracy jest starannie napisana, z dokładnym opisem przebudowy w obrębie nabłonka jelita cienkiego wraz ze zmianami na poziomie molekularnym, komórkowym i tkankowym. Najbardziej krytycznym okresem w rozwoju przewodu pokarmowego wydaje się być okres poodsadzeniowy, co jest wynikiem drastycznego zmniejszenia pobierania paszy, zmiany składu i konsystencji pokarmu oraz stresu środowiskowego. Druga część wstępu dotyczy metabolizmu lipidów oraz ich roli w żywieniu, wpływu na przewod pokarmowy oraz regulacji homeostazy energetycznej. W tej części pracy, niewątpliwie na szczególną uwagę zasługuje podrozdział dotyczący znaczenia i absorpcji kwasów tłuszczowych u wcześniaków. Niedojrzałość przewodu pokarmowego wcześniaków jest przyczyną opóźnienia wzrostu oraz nawracających infekcji rzutujących na rozwój organizmu. Przystawianie tłuszczów u wcześniaków jest ograniczone ze względu na niewydolność wydzielniczą trzustki, a karmienie pasteryzowanym mlekiem dawczyń czy preparatami mlekozastępczymi nie zapewnia właściwego balansu podaży długołańcuchowych wielonasyconych kwasów tłuszczowych przy jednoczesnym upośledzeniu przyswajalności LCPUFA. Opracowanie właściwego modelu żywieniowego wcześniaków stało się możliwe dzięki zbliżonym profilom wymagań dietetycznych człowieka i świni. Wagę i trafność tego zagadnienia (modelu wcześniactwa) podkreśla wcześniejsza publikacja, której współautorem jest mgr inż. Paulina Szczurek, w czasopiśmie z bazy JCR, w *Journal of biological regulators and homeostatic agents* (IF: 1.397) pt. *The pig as a model for premature infants - the*

importance of immunoglobulin supplementation for growth and development. Pragnę zauważyć, że we wspomnianym wyżej podrozdziale znalazły się cytowania najnowszej literatury przedmiotu (2017-2018), czego zabrakło w pozostałej części wstępu, który w zdecydowanej części został oparty na kilku pracach sprzed trzech, czterech lat i zdecydowanie starszych (znaczną część). We wstępie zabrakło również szerszego ujęcia znaczenia mikrobiomu w rozwoju i funkcji układu pokarmowego. Mimo powyższych uwag wstęp, rzetelnie przygotowany przez mgr inż. Paulinę Szczurek, napisany został poprawnym, naukowym językiem z wykorzystaniem branżowej terminologii. Drobne potknięcia językowe i edytorskie nie obniżają jego wartości merytorycznej.

Wprowadzenie literaturowe stało się przesłanką do postawionego ogólnego celu pracy oraz celów szczegółowych. Zaprojektowane zostały dwa doświadczenia, z których jedno dotyczyło oceny wpływu egzogennej lipazy na absorpcję kwasów tłuszczowych i wzrost nowo narodzonych prosiąt (model żywienia wcześniaków u ludzi). Drugie doświadczenie miało umożliwić ocenę wpływu modyfikowanej diety, o różnym profilu kwasów tłuszczowych, stosowanej u odsadzonych zwierząt na szereg parametrów biologicznych i produkcyjnych. Postawione w pracy hipotezy badawcze są trafne i nie budzą zastrzeżeń. Jedna drobna uwaga dotyczy drugiej hipotezy, w której Doktorantka używa sformułowania „...pozytywnie wpłynie na stan metaboliczny organizmu”. Wydaje się, że trafniejszym określeniem byłoby „...pozytywnie wpłynie na wybrane parametry metaboliczne organizmu”.

Materiały i metody są szczegółowo opisanymi rozdziałami i obejmują 20 stron wydruku komputerowego. Procedury doświadczeń z użyciem zwierząt zostały przeprowadzone na podstawie stosownych pozwoleń (M181-15, nr 15/2016). Materiał do badań stanowiły wyjściowo 32 (28) prosięta w I doświadczeniu oraz 18 knurków w II doświadczeniu. Protokoły obu doświadczeń zostały poprawnie opisane, chociaż zabrakło pewnej konsekwencji w opisie zwierząt w obu doświadczeniach. W opisie doświadczenia I nie znajdujemy informacji o płci wykorzystanych prosiąt przy jednoczesnym szczegółowym opisie typu mieszańcowego. Nasuwa się zatem pytanie, czy w doświadczeniu I (podobnie jak w II) wykorzystano tylko osobniki płci męskiej i dlaczego. Z kolei w opisie doświadczenia II zabrakło bardziej szczegółowej charakterystyki syntetycznej linii 990 przy jednoczesnym uwzględnieniu płci zwierząt. W związku z powyższym pojawia się pytanie o charakterze dyskusyjnym, które proszę podjąć w trakcie publicznej obrony rozprawy, na ile płeć osobnika (na bardzo wczesnym oraz późniejszym etapie rozwoju organizmu) może wpływać na wykorzystanie i przyswajalność składników odżywczych, w szczególności na metabolizm tłuszczów z uwzględnieniem uwarunkowań hormonalnych i środowiskowych. Kolejnym istotnym, godnym poruszenia zagadnieniem jest wpływ diety matek na skład mikrobiomu potomstwa, który z kolei wpływa na rozwój i funkcjonowanie mikrobiomu (Jiang i inni, 2018; Pivik i inni, 2019).

Podrozdział dotyczący analizy ekspresji genów został potraktowany oszczędnie w opisie zarówno w sekcji materiałów i metod, jak również w sekcji wyników (komentarz w

dalszej części recenzji). Do analizy wybrano cztery geny związane z regulacją homeostazy energetycznej w podwzgórzu i chociaż ich wybór jest uzasadniony (informacje zamieszczone we wstępie) zabrakło choćby krótkich, molekularnych charakterystyk tych genów. Ma to szczególne znaczenie w przypadku genów takich jak *FABP7*, dla którego alternatywne składanie prowadzi do powstania wielu wariantów transkryptu kodujących różne izoformy, a pseudogeny tego genu występują na wielu chromosomach. W pracy nie odnajdujemy również wyjaśnienia, dlaczego zdecydowano się zastosować gen *OAZ1* jako kontrolę endogenną. Zwykle stosowanymi genami referencyjnymi w analizach ekspresji metodą *real-time* PCR są *ACTB*, *GAPDH*, *B2M*. Czy przeprowadzono zatem optymalizację warunków dla kontroli endogennej? *RNA Integrity Number* jest algorytmem służącym do oceny integralności RNA, jednakże w pracy nie podano zakresu, jaki kwalifikuje RNA do wykorzystania do dalszych analiz lub zamiennie, nie umieszczono stosowanego słownego komentarza. Tabela 7 zawiera angielskie nazwy genów zamiast polskie, a sekwencje starterów zostały podane tylko dla genu *OAZ1* w stosownie nazwanej kolumnie. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku sekwencji sond. Zabrakło również określenia jednostki w jakiej wyrażona jest długość amplicjonu. Podrozdział 4.2.8. zawiera omyłkowy odnośnik do sekcji 5.1.7. (powinno być 4.1.7). Strona edytorska tej części pracy nie budzi większych zastrzeżeń, chociaż zabrakło kursywy przy niektórych łacińskich nazwach gatunkowych i angielskich nazwach genów, co jest konieczne przy użyciu obcojęzycznych zwrotów w pisanym języku polskim. Zarówno RNA jak DNA to kwasy, zatem poprawnie należałoby sformułować zdanie: „RNA został wyizolowany...”. Autorka stosuje zamiennie określenie stan i status zdrowotny, przy czym bardziej trafnym określeniem wydaje się być stan zdrowotny zwierząt. Podsumowując część pracy dotyczącą metod, pragnę wyrazić podziw dla Doktorantki za znajomość szerokiego wachlarza metod chromatograficznych, mikroskopowych, analizy zmiany ekspresji genów i metod statystycznych.

Chcąc stworzyć wiarygodny zwierzęcy model wcześniactwa człowieka należy mieć na uwadze, że odsetek dzieci urodzonych przed 37 tygodniem ciąży rośnie. W Polsce, w roku 2016 na około 320 tys. urodzonych dzieci przypadało 7,5% wcześniaków. Zgodnie z zasadami doboru próby badawczej z uwzględnieniem, iż model badawczy stworzony w doświadczeniu I jest technicznie trudnym (model dużych zwierząt gospodarskich) myślę, że należałoby się zastanowić w przyszłości nad zwiększeniem liczebności osobników przy jednoczesnym zachowaniu wysokiego standardu opieki weterynaryjnej. Wnioski powstałe na podstawie tej części doświadczenia są poprawnie sformułowane i bardzo cenne, lecz wymagałyby dodatkowych badań celem ich rozszerzenia.

W wynikach dotyczących analizy poziomu ekspresji wybranych genów w podwzgórzu prosiat nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami dla żadnego z analizowanych genów. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie sformułowania, iż można zauważyć **pozytywny trend** dla poziomu ekspresji wszystkich analizowanych genów względem grupy kontrolnej. Niestety w Tabeli 22 (choć w podpisie wskazano)

nie podano wartości \pm SD, co ogranicza czytelnikowi możliwości interpretacyjne wyników. Należy zaznaczyć, że powtarzalność wyników uzyskiwanych przy pomocy techniki *real-time* PCR w znacznym stopniu zależy od jakości i czystości materiału do analizy oraz sprawności i dokładności laboratoryjnej badacza. Czy przeprowadzono zatem kontrolę negatywną w analizie celem sprawdzenia czystości odczynników, względnie wykluczenia ewentualnej ich kontaminacji obcym materiałem genetycznym?

Sekcja wyników została bardzo dobrze udokumentowana na 34 stronach w postaci pisanego tekstu, 22 tabel, 4 wykresów i 8 fotografii, co zasługuje na szczególne wyróżnienie. Przejrzysta i logiczna prezentacja wyników rzutuje bardzo pozytywnie na całość rozprawy doktorskiej.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

1. Stworzenie wiarygodnego modelu żywienia wcześniaków u człowieka, nad którym prace powinny być kontynuowane także w innych aspektach.
2. Wykazanie, że zastosowanie hydrolizy tłuszczów (obecnych w mieszance mlecznej) immobilizowaną lipazą RO zwiększa ich przyswajalność u przedwcześnie urodzonych osobników oraz pozytywnie wpływa na morfologię jelita.
3. Wykazanie, że ilość, rodzaj oraz struktura tłuszczów w diecie ma istotny wpływ na ich absorpcję, a w konsekwencji na wzrost, strukturę przewodu pokarmowego oraz wybrane parametry metaboliczne prosiąt.

Dyskusja jest bardzo szeroka i została podzielona na podrozdziały będące osobnymi odnośnikami do uzyskanych wyników w doświadczeniu I i II, co niewątpliwie ją porządkuje i świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. W dyskusji, pani mgr inż. Paulina Szczurek umiejętnie konfrontuje wyniki swojej pracy z wynikami dostępnymi w światowej anglojęzycznej literaturze. Rozprawę doktorską kończy 15 poprawnie sformułowanych wniosków i stwierdzeń, które są odpowiedziami na wcześniej sformułowane hipotezy badawcze. Umieszczone na końcu rozprawy streszczenia pracy w języku polskim i angielskim są napisane poprawnie, choć w ocenie recenzenta zbyt długie.

Wniosek końcowy:

Reasumując należy uznać, że praca doktorska pani mgr inż. Pauliny Szczurek jest pracą naukową o charakterze poznawczym. Praca została zredagowana i napisana w poprawnej formie, zgodnie z kanonami obowiązującymi przy pisaniu tego rodzaju opracowań. Odnosząc się do zakresu przedstawionych informacji należy uznać, że Doktorantka posiada dużą wiedzę w zakresie badanej tematyki. Posiada również umiejętność prawidłowego doboru i wykorzystania warsztatu badawczego. Wskazane w recenzji uchybienia są przede wszystkim sugestiami mającymi podnieść wartość opracowania i zwiększyć jakość prezentowanych wyników w przyszłości.

Mając na uwadze wysoką jakość badań, dojrzałość naukową Doktorantki, jak i potencjał aplikacyjny oraz użyteczność przedstawionych wyników rozprawy doktorskiej nie ma wątpliwości, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr inż. Pauliny Szczurek pod tytułem „Metabolizm lipidów i jego rola w regulacji rozwoju przewodu pokarmowego u prosiąt” spełnia wszystkie wymagania określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 z 2003 r., poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytut Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie o dopuszczenie pani mgr inż. Pauliny Szczurek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 28. lutego 2019 r.



Dr hab. Joanna Zeyland