

Jastrzębiec, 18 marca 2019 r.

Dr hab. Rafał R. Starzyński

Zakład Biologii Molekularnej

Zespół Biologii Molekularnej Żelaza

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu

Ocena rozprawy doktorskiej¹ mgr. inż. Pauliny Szczurek

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

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. inż. Pauliny Szczurek pod w/w tytułem jest jednostronnym wydrukiem komputerowym składającym się ze 170 stron formatu A4. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich w dziedzinie nauk eksperymentalnych z zakresu biologii, czy nauk o życiu i podzielony jest na 8 uporządkowanych i starannie opracowanych rozdziałów (tj. wstęp, założenia i cel pracy, hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski i stwierdzenia, piśmiennictwo). Ponadto do pracy dołączono wykaz skrótów, spisy tabel, wykresów oraz fotografii. Rozprawa zawiera także 2 jednobrzmiące streszczenia w języku polskim i angielskim. Wyniki badań są poparte odpowiednio zredagowanymi wykresami, tabelami i ilustrowane dokumentacją fotograficzną. Doktorat został napisany starannie pod względem językowym, choć Autorka nie ustrzegła się kalek z języka angielskiego chociażby opisując pobieranie materiału badawczego jako „kolekcję” tkanek, użycie terminu „obesegenny”, a nie obesogenny, czy angielskie knock-out gdy Słownik języka polskiego PWN podaje spolszczone nokaut, a wyrażenie malabsorpcja można zastąpić barokowym Zespołem upośledzonego wchłaniania. Ponadto, Recenzent nie jest

¹ Przygotowano wg wytycznych w: Rozporządzenie 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 (dziennik Ustaw Rzeczypospolitej polskiej, Warszawa, dnia 14 października 2014 r. Poz. 1383) na podstawie art. 31 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, poz. 595, z późn. zm.).

w stanie wyjaśnić znaczenia kilkakrotnie użytego słowa „akrecja”, mającego swoje odpowiednie znaczenie w geologii. Przypuszczalnie chodzi tutaj o gromadzenie, akumulację. Należy również mieć na uwadze, że w języku polskim kwas (RNA czy DNA) to rodzaj męski, a zatem został wyizolowany oraz przepisany. Również użycie skrótu myślowego „absorpcja kwasów tłuszczowych w osoczu prosiąt” może wprowadzać czytelnika w błąd. Inne, mniej ważne i nie wpływające na wartość poznawczą dysertacji uchybienia załączam w przedstawionym mi do recenzji manuskrypcie.

Pracę realizowano w Instytucie Zootechniki PIB pod opieką promotorską dr. hab. Marka Pieszki i dr. hab. Jarosława Wolińskiego. Po lekturze zamieszczonych podziękowań Doktorantki, wnoszę, że jedna z części doświadczalnych przeprowadzona została na Uniwersytecie w Lund we współpracy z prof. dr. hab. Stefanem Pierzynowskim.

Ocena merytoryczna pracy

W świetle badań ostatnich 10 lat tłuszcze dostarczane wraz z pożywieniem przestały stanowić dla badaczy jedynie mniej lub bardziej przystępne źródło energii, czy budulec błon białkowo-lipidowych. Jako związki wysokoaktywne biologicznie tłuszcze mogą wykazywać aktywność regulatorową w szeregu procesów fizjologicznych jak i patofizjologicznych. Aktywność biologiczna tłuszczu uwidacznia się w takich procesach biologicznych jak modulacja odpowiedzi immunologicznej, aktywności białek enzymatycznych, regulacja natężenia stresu tlenowego, gospodarki hormonalnej czy proliferacja komórek i programowanej śmierci komórkowej. Aktywność biologiczna tłuszczu związana jest głównie z ich budową, podażą ale przede wszystkim biodostępnością. Autorka skupiła się na dwóch etapach życia postnatalnego, gdy biodostępność kwasów tłuszczowych jest obniżona, mianowicie na okresie wcześniactwa i okresie podsadzeniowym prosiąt. Pierwszy okres związany jest ściśle z niedorozwojem, niedojrzałością układów enzymatycznych jelita, głównie braku sekrecji lipazy trzustkowej, drugi związany jest ze spadkiem „pojemności absorpcyjnej jelita” polegającej na zmniejszeniu długości kosmków jelitowych, hiperplazji krypt, co prowadzi do upośledzenia trawienia i absorpcji składników pokarmowych.

Autorka dysertacji podjęła się ambitnego i ciekawego z punktu widzenia nauki celu, jakim jest zbadanie roli wybranych kwasów tłuszczowych i ich poziomu w diecie na strukturę

¹ Przygotowano wg wytycznych w: Rozporządzenie 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 (dziennik Ustaw Rzeczypospolitej polskiej, Warszawa, dnia 14 października 2014 r. Poz. 1383) na podstawie art. 31 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, poz. 595, z późn. zm.).

przewodu pokarmowego, wzrost oraz ogólny status zdrowotny zwierząt w dwóch newralgicznych momentach życia postnatalnego, w okresie wczesniaczym i poodwadzeniowym. W ocenianej rozprawie doktorskiej zostały sformułowane dwie ciekawe i oryginalne hipotezy badawcze. Pierwsza zakłada, że zastosowanie egzogennej lipazy pochodzenia mikrobiologicznego zwiększy przyswajalność kwasów tłuszczowych i będzie mieć pozytywny wpływ na rozwój jelita w okresie wczesniactwa, a tym samym pozytywnie wpłynie na parametry produkcyjne prosiąt. Założenie poprawne jednak nieweryfikowalne w przedstawionej dysertacji z uwagi na fakt, że parametry produkcyjne mogą być mierzone w trakcie tuczu, bądź poubojowo w doświadczeniu długoterminowym. Zatem hipoteza powinna brzmieć: zwiększenie udziału tłuszczów w diecie pozytywnie wpłynie na parametry metaboliczne organizmu i w konsekwencji na rozwój strukturalny przewodu pokarmowego oraz przyrostyienne w okresie wczesniaczym. Druga hipoteza, ryzykowna, zakłada, że zwiększenie udziału tłuszczów w diecie powyżej obecnych zaleceń żywieniowych pozytywnie wpłynie na stan zdrowia i w rezultacie poprawi parametry produkcyjne prosiąt. Zatem i w tym przypadku badania długoterminowe są ze wszech miar pożądane. Niestety, z lektury dysertacji nie można również wywnioskować, czy badania przeprowadzono na grupach jednopłciowych czy mieszanych.

W przedstawionej dysertacji na podstawie postawionych celów badawczych pracy Autorka formułuje hipotezy badawcze. Zazwyczaj w nauce najpierw stawiane są hipotezy, następnie określone są cele pracy oraz założenia, jakie mają być zrealizowane w zaproponowanych konkretnych doświadczeniach naukowych. Zakładam zatem, że w celu weryfikacji hipotez badawczych Doktorantka przeprowadziła dwa eksperymenty na zwierzętach.

Pierwsze doświadczenie miało na celu zbadanie wpływu egzogennej lipazy, czyli egzogennej hydrolizy tłuszczów zawartych w mieszance mlecznej na przyswajalność kwasów tłuszczowych i rozwój przewodu pokarmowego. Niebagatelnym staje się również fakt, że przeprowadzone badania stanowią idealne źródło wiedzy dla wykorzystania przedwcześnie urodzonych prosiąt (przez cesarskie cięcie) jako modelu dla ludzkich wcześniaków. Powstaje pytanie, czy również dla wcześniaków ludzkich urodzonych siłami natury. Na uwagę zasługuje fakt dojrzałej analizy modelu zwierzęcego, gdzie Doktorantka wykazuje jego mankamenty

¹ Przygotowano wg wytycznych w: Rozporządzenie 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 (dziennik Ustaw Rzeczypospolitej polskiej, Warszawa, dnia 14 października 2014 r. Poz. 1383) na podstawie art. 31 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, poz. 595, z późn. zm.).

takie jak: silna selekcja na liczebność miotów, czy szybki wzrost pourodzeniowy, a zatem odmienne zapotrzebowania pokarmowe. Czy zdaniem Autorki zaproponowane w dysertacji modele zwierzęce mogą posłużyć w badaniach nad etiologią takich chorób jak choroba Leśniowskiego-Crohna lub generalnie zespołu krótkiego jelita? W tym miejscu należy podkreślić, że autorka pracy nie dość jasno wytłumaczyła, na jakiej podstawie dokonano kalkulacji porównującej 107 dzień ciąży lochy z 32 tygodniem ciąży w przypadku noworodków ludzkich. Z moich obliczeń wynika również, że w Doświadczeniu I wykorzystano o 4 zwierzęta więcej niż jak to podano w rozdziale Materiały i Metody. Zalecaną praktyką pisania prac naukowych, w tym rozpraw doktorskich jest zamieszczanie schematów doświadczeń, czy schematów procesów i szlaków, co w znacznym stopniu ułatwia czytelnikom (w tym Recenzentowi) prawidłowe wnioskowanie. W doświadczeniu wykorzystano zestaw do hydrolizy tłuszczów, standardowo stosowany na oddziałach intensywnej opieki neonatologicznej, za pomocą którego otrzymywano mieszankę mleczną zawierającą preparat wzbogacony o kwasy DHA i ARA. Jak podaje Doktorantka „mieszankę dla grupy kontrolnej przygotowywano analogicznie, nie poddając jej jednak działaniu egzogennej lipazy”. Czy zatem kontrolna mieszanka mleczna została naniesiona na kolumnę pozbawioną aktywności lipazy z *Rhizopus oryzae*? Zawsze istnieje ryzyko, że na złożu kolumny mogą być immobilizowane makro i mikroelementy mieszanki mlecznej. Co więcej, czy w Tabeli 3 przedstawiono wyniki analizy mieszanki mlecznej po hydrolizie na obecność kwasów DHA i ARA? Są to pytania ważne w kontekście zasadności porównywania warunków doświadczalnych w grupach.

Na szczególną uwagę zasługuje natomiast procedura karmienia dojelitowego poprzedzona skomplikowanymi zabiegami chirurgicznymi. Możliwość uczestniczenia w tego typu zabiegach, czy chociażby tylko ich obserwacji, jest dla Doktorantki niewątpliwie elementem nabierania i doskonalenia doświadczenia zawodowego.

Najważniejszym osiągnięciem pierwszej części pracy doświadczalnej w przedstawionym doktoracie jest wykazanie, że zastosowanie egzogennej hydrolizy tłuszczów zawartych w mieszance mlecznej lipazą pochodzenia mikrobiologicznego prowadzi do wzrostu absorpcji kwasów tłuszczowych w jelicie, a nie jak omyłkowo twierdzi Autorka w osoczu, korzystnie wpływając na morfologię jelita czczego prosiąt przedwcześnie urodzonych. Co

¹ Przygotowano wg wytycznych w: Rozporządzenie 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 (dziennik Ustaw Rzeczypospolitej polskiej, Warszawa, dnia 14 października 2014 r. Poz. 1383) na podstawie art. 31 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, poz. 595, z późn. zm.).

więcej, biomedyczny aspekt prowadzonych badań wskazuje na możliwość wykorzystania prosiąt jako modelu dla wcześniaków ludzkich oraz daje podstawy do wykorzystania złoża PrEFIC w opracowaniu funkcjonalnej formuły mleka, która zapewnia podaż LCPUFA (długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych) w osoczu wcześniaków w krytycznych, pierwszych tygodniach życia. Intrygującym z punktu widzenia czytelnika wynikiem tej części pracy jest niezmienny poziom DHA (kwasu dekozaheksaenowego), jak również ARA (kwasu arachidonowego) w osoczu prosiąt urodzonych przedwcześnie w 107 dniu ciąży w stosunku do prosiąt urodzonych o czasie czyli w 115 dniu (Tabele 8, 9, 10 i 11). Czy brak różnic może wynikać z faktu, że jednak 107 dzień ciąży lochy nie odpowiada 32 tygodniowi ciąży kobiety, a przewód pokarmowy jest znacznie lepiej rozwinięty w tym czasie od tego, co zakładała Autorka? Należy dodać, że fizjologiczna ciąża kobiety jak podają źródła trwa 39 ± 1 tygodni (280 dni), zatem początek 3 trymestru to 225 dzień.

Zgodnie z wynikami badań dostępnymi w literaturze 10 dniowa suplementacja DHA i ARA nie spowodowała istotnych zmian w ich poziomie zarówno w mózdzku, jak i korze wzrokowej. Jak słusznie zauważa Doktorantka brak zmian może wynikać ze zbyt krótkiego okresu suplementacji lub odmiennych mechanizmów absorpcji kwasów w mózgowiu, co niekoniecznie znajduje odzwierciedlenie w poziomie kwasów w osoczu krwi, czy innych tkankach i narządach. Jaki zatem był powód zaniechania pomiaru ARA i DHA w wątrobie prosiąt? Co więcej, analiza transkryptomiczna wątroby prosiąt poddanych suplementacji LCPUFA jest ze wszech miar wskazana przy planowaniu analiz w przyszłości. Może ona dostarczyć ogromnej wiedzy na temat funkcjonowania szlaków biochemicznych związanych z metabolizmem tłuszczów w okresie okołoporodowym. W tym miejscu, jeśli mogę, chciałbym zaproponować również rozszerzenie panelu analiz o florę jelitową, zwaną także mikrobiomem, której skład zależy również od momentu kolonizacji jelita po porodzie. Jak wiadomo skład flory jelitowej pełni nie tylko funkcje trawienne, ale również ochronne (indukuje syntezę mucyny), zdrowotne (chroni przed przerostem flory patogennej), immunomodulacyjne (indukuje syntezę IgA). Co więcej, w kontekście przedstawionej pracy należy wspomnieć o roli flory bakteryjnej w dostarczaniu SCFA (krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych) jako źródła energii dla nabłonka jelit.

¹ Przygotowano wg wytycznych w: Rozporządzenie 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 (dziennik Ustaw Rzeczypospolitej polskiej, Warszawa, dnia 14 października 2014 r. Poz. 1383) na podstawie art. 31 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, poz. 595, z późn. zm.).

Autorka zauważa także, z czym się w pełni zgadzam, że model zwierzęcy wcześniactwa zaprezentowany w dysertacji może być wiarygodnym dla zrozumienia patofizjologii przewodu pokarmowego wcześniaków ludzkich, jednak należy pamiętać, że prosięta i niemowlęta ludzkie wykazują wiele różnic fizjologicznych. Ponadto, jak stwierdza Autorka, prosięta wykazują nie tylko „odrobinę” odmienne zapotrzebowanie na poszczególne składniki pokarmowe, ale z uwagi na tempo wzrostu w pierwszych 4 tygodniach życia określenie „odrobinę” należałoby zmienić na „skrajnie”. Przykładem takiego skrajnie odmiennego zapotrzebowania może być zapotrzebowanie na jony żelaza, których wymuszona podaż chroni prosięta przed niedokrwistością na tle niedoboru tego pierwiastka. Podobnie, według Doktorantki skład mleka maciory różni się „nieznacznie” od składu mleka kobiecego. Poziom minerałów w mleku maciory może być 5-krotnie wyższy niż w mleku kobiet (1 vs. 0,2%). Również poziom białka przemawia na korzyść lochy (6 vs. 1,1%), przy wyższym poziomie laktozy (4 vs 6,8%) i tłuszczu (5 vs. 8%) w mleku ludzkim.

Odsadzenie to okres w rozwoju prosiąt charakteryzujący się gwałtownymi zmianami w dotychczasowym systemie zarówno żywienia jak i utrzymania. Okres ten charakteryzuje się mniejszym pobieraniem paszy oraz zmianami w strukturze i funkcji jelita. W doświadczeniu II mgr Paulina Szczurek zakłada, że wzbogacenie paszy o olej lniany i olej palmowy powyżej rekomendacji żywieniowych pozytywnie wpłynie głównie na rozwój strukturalny przewodu pokarmowego, co udowadnia i czemu poświęca znakomitą część wnikliwej dyskusji. Autorka stwierdza również, że zwiększenie zawartości w/w tłuszczów nie wywołuje reakcji zapalnych w organizmie. W kontekście trwającej debaty naukowej i medialnej dotyczącej bezpieczeństwa wykorzystania oleju palmowego (frakcjonowanego czy utwardzanego), zasadne wydaje się pytanie, na podstawie jakich wyników badań wyciągnięto takie wnioski?

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka wnikliwie analizuje uzyskane wyniki na tle literatury światowej i dokładnie je interpretuje. Dyskusja nawiązuje tematycznie i konsekwentnie do poszczególnych etapów przeprowadzonych doświadczeń oraz uzyskanych wyników. Sposób jej przedstawienia wskazuje na dużą znajomość zagadnienia oraz umiejętność wnikliwego poszukiwania interpretacji uzyskanych wyników, choć nie zawsze jest to możliwe. Autorka wskazuje na przykład na małą liczebność zwierząt w grupie, czy

¹ Przygotowano wg wytycznych w: Rozporządzenie 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 (dziennik Ustaw Rzeczypospolitej polskiej, Warszawa, dnia 14 października 2014 r. Poz. 1383) na podstawie art. 31 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, poz. 595, z późn. zm.).

pochodzenie wszystkich 36 zwierząt od dwóch matek jako na czynnik limitujący prawidłowe wnioskowanie na podstawie otrzymanych wyników.

Dysertację kończą „Wnioski i stwierdzenia”. Abstrahując od ich liczby (15) nasuwa się pytanie, które z nich to wnioski, a które stwierdzenia i jakim kluczem Autorka posłużyła się w ich kategoryzacji?

Podsumowanie

Po dokładnym zapoznaniu się z przedstawioną mi do oceny rozprawą doktorską mgr. inż. Pauliny Szczurek uważam, że w pracy podjęto i rozwiązano oryginalny problem naukowy a Autorka posiadała wymaganą znajomość warsztatu metodycznego badań na zwierzętach i zastosowanej analityki laboratoryjnej. Nie budzi również moich wątpliwości, że uzyskane umiejętności Doktorantka wykorzysta z powodzeniem w pracy doświadczalnej, czy innej pracy zawodowej. Dojrzała, choć miejscami zbyt długa dyskusja, wskazuje, że Autorka posiadała umiejętności krytycznego podsumowania wyników badań własnych w odniesieniu do dostępnej literatury. Badania mgr inż. Pauliny Szczurek doprowadziły do istotnego poznawczo odkrycia, które, co warte podkreślenia może mieć szerokie znaczenie praktyczne. Uwagi krytyczne Recenzenta nie umniejszają wartości naukowej dysertacji, a jedynie dają przyczynek do dalszej dyskusji.

Mając powyższe na uwadze pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. inż. Pauliny Szczurek pt. „Metabolizm lipidów i jego rola w regulacji rozwoju przewodu pokarmowego u prosiąt” w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z późniejszymi zmianami. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o dopuszczenie mgr. inż. Pauliny Szczurek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję do Szanownej Rady o wyróżnienie w/w pracy doktorskiej.

Rafał Radosław Starzyński
Dr hab. inż. Profesor I GiHZ PAN

¹ Przygotowano wg wytycznych w: Rozporządzenie 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 (dziennik Ustaw Rzeczypospolitej polskiej, Warszawa, dnia 14 października 2014 r. Poz. 1383) na podstawie art. 31 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, poz. 595, z późn. zm.).