

Prof. dr hab. n. wet. Marta Siemieniuch,

Popielno, dnia 5.09.2023.

Stacja Badawcza Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN,
Popielno 25, 12-220 Ruciane-Nida

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Patrycji Wróblewskiej,

pt.: „Laktofermentowane wysłodki buraczane jako czynnik uwrażliwiający na insulinę konie z syndromem metabolicznym EMS” wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Andrzeja Wiliczkiwicza, prof. uczelni z Katedry Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Zespół metaboliczny koni (ang. *Equine Metabolic Syndrom* – EMS) jest złożonym procesem, którego patofizjologia nie jest w pełni poznana. Uważano, że rasami predysponowanymi do wystąpienia zespołu metabolicznego są konie ras prymitywnych, o których mówi się często, że są „łatwe w utrzymaniu” (ang. „*easy keepers*”), w tym konie rasy huculskiej, koniki polskie, fiordingi, haflingery i kuce, niemniej jednak EMS był opisywany również u koni czystej krwi arabskiej, koni pełnej krwi angielskiej, kłusaków, koni rasy Tennessee walking i quarter. Obecnie uważa się, że mimo pewnych predyspozycji rasowych, choroba ta jest spotykana u wszystkich ras koni. Doniesienia naukowe wskazują, że w ostatnich latach nadmierną masę ciała i otyłość spotyka się u około 50% populacji koni w USA, jak również w pozostałych częściach świata. Należy więc obawiać się wystąpienia otyłości i powiązanego z nią zespołu metabolicznego, u coraz większej liczby koni. Mechanizmy leżące u podstaw otyłości nie są do końca poznane, jednakże przekarmianie w połączeniu z ograniczoną aktywnością fizyczną wydają się być czynnikami spowolniającymi metabolizm i uważane są za główne czynniki sprawcze otyłości, podobnie zresztą jak u innych gatunków zwierząt oraz u ludzi. Zespół metaboliczny stanowi zespół niepożądanych zmian, upośledzających fizjologię, ściśle ze sobą połączonych, które obejmują zarówno zaburzenia metaboliczne jak również immuno-endokrynne. Zespół metaboliczny u koni rozpoznawany jest na podstawie obecności insulinooporności, otyłości, miejscowego odkładania tłuszczu oraz wcześniej przebytego lub obecnie trwającego ochwatu. Przebyty ochwat stwierdza się na

podstawie wywiadu lub obecności charakterystycznych rozbieżnych pierścieni na kopycie, będących wynikiem wcześniejszych podklinicznych ochwatów. U niektórych koni na zdjęciach RTG można zauważyć rotację kości kopytowej, chociaż kulawizna może nie być widoczna w momencie badania. Schorzenie samo w sobie nie jest śmiertelne, niemniej jednak z powodu ogromnej bolesności i utraty właściwości lokomotorycznych konia, często kończy się eutanazją ze względów etycznych. Dodatkowo, w przebiegu EMS stwierdza się zaburzenia układu odpornościowego. Są one nieswoiste i mają głównie charakter przewlekłego, często podklinicznego procesu zapalnego. Zaburzenia immuno-endokryne w przebiegu EMS negatywnie wpływają również na cykliczność płciową klaczy i rozwój wczesnej ciąży, prowadząc do dalszych strat ekonomicznych w hodowli koni. Z tego też powodu zespół metaboliczny koni może być traktowany jako zespół różnorodnych objawów patologicznych, mających przełożenie na zdrowotność oraz ekonomię w chowie i hodowli koni, a poszukiwanie środków prowadzących do obniżenia występowania tego zespołu objawów, jest jak najbardziej racjonalne i uzasadnione z ekonomicznego, jak i klinicznego punktu widzenia.

Recenzowana praca doktorska liczy w sumie 166 stron maszynopisu, w ramach których zostały zawarte następujące rozdziały: spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, przegląd literatury, cele pracy, materiały i metody, omówienie wyników wraz z graficzną formą ich prezentacji, dyskusja, podsumowanie, piśmiennictwo oraz spis tabel, wykresów i rycin. Układ pracy jest poprawny, zgodny z ogólnie przyjętymi normami. Moją uwagę od pierwszej chwili przykuła duża objętość przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, m.in. ilość rycin, wykresów, jak również pozycji piśmiennictwa. Za „Spisem treści” znajduje się „Objaśnienie zastosowanych skrótów”, które jest pomocne podczas zapoznawania się z dalszą częścią pracy.

Wstęp i przegląd literatury

W rozdziale pt.: „Streszczenie” Autorka zwięźle wprowadza czytelnika w zagadnienia, które będzie następnie obszernie poruszała w kolejnym rozdziale. Jest tu bardzo rzeczowe nakreślenie problemu zespołu metabolicznego u koni, następnie uzasadnienie zainteresowania żywnością laktofermentowaną, zarysowanie celu badań, uzyskanych wyników oraz krótkie podsumowanie.

Przed rozdziałem pt.: „Przegląd literatury”, znajduje się jednostronicowe „Wprowadzenie”, w którym Autorka zarysowuje problem nasilającego się występowania

zespołu metabolicznego, nie tylko u zwierząt, ale i u ludzi, który w niektórych obszarach naszego globu zaczyna przybierać rozmiar epidemii.

Rozdział zatytułowany „Przegląd literatury” znajduje się na 12 stronach maszynopisu. Na pierwszych stronach Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z problemem występowania zespołu metabolicznego u koni, m.in. nakreśla, które rasy koni mają szczególną predyspozycję do wystąpienia EMS i jaka jest etiologia tego zaburzenia. W poszczególnych podrozdziałach znajduje się opis zaburzeń składających się na obraz zespołu metabolicznego u koni, do których zalicza się: otyłość, insulinooporność, ochwat. Następnie Autorka skupia się na opisie zastosowania pro- i prebiotyków w żywieniu koni, opisując w kolejnej części rolę wysłodków buraczanych, jako źródła prebiotyku w żywieniu koni. W tym rozdziale Autorka wspomina o moczeniu pasz, jako pożądanym rozwiązaniu dla koni cierpiących na zespół metaboliczny, ponieważ moczenie powoduje usunięcie znacznej części węglowodanów niestrukturalnych. Zgadzam się z tym stwierdzeniem, jednakże w wyniku moczenia siana, podawanego koniom np. z ochwatem, płyn pozostający po moczeniu, w którym znajdują się cukry, jest usuwany. Natomiast moczenie wysłodków stosuje się dlatego, że jest to materiał paszowy znacznie pęczniejący i w przypadku podania koniowi wysłodków bez uprzedniego moczenia, napęcznieją one w przewodzie pokarmowym, prowadząc do zaburzeń o różnicowanym, nawet ciężkim przebiegu. Tak więc po moczeniu wysłodków nie jest usuwany płyn, który zawiera cukry, jak ma to miejsce w przypadku moczenia siana. Podrozdział dotyczący laktofermentacji żywności i korzystnego wpływu fermentowanej żywności na zdrowotność ludzi i zwierząt, kończy „Przegląd literatury”. Rola rozdziału pracy doktorskiej, obejmującego przegląd piśmiennictwa, z jednej strony polega na wprowadzeniu czytelnika bezpośrednio w przedmiot badań, a z drugiej strony jest źródłem informacji o wiedzy i stopniu przygotowania autora do prowadzenia badań w danym kierunku. W mojej ocenie Doktorantka wywiązała się z tych zadań w stopniu bardzo dobrym.

Cele badawcze

Następnie sformułowano cele badawcze, a przyjęty kierunek badań należy uznać za uzasadniony. Doktorantka obrała za cel główny wytworzenie laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem dwóch szczepów bakterii probiotycznych i scharakteryzowanie chemiczne powstałych w wyniku fermentacji produktów. Autorka formułuje cel dodatkowy, którym była ocena wpływu ekstraktów wysłodków fermentowanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* i bez dodatku tego szczepu, podczas badań *in vitro* w kulturach komórek macierzystych tkanki tłuszczowej konia. Po zapoznaniu się z dalszą częścią pracy i ogromem

badan *in vitro*, które Autorka przeprowadziła przy użyciu hodowli komórkowych, wydaje mi się, że słowo „dodatkowy” nie jest w tym przypadku adekwatne bo sugeruje, że badania *in vitro* są pomniejszą częścią tej dysertacji, a w zasadzie te dwa cele są równorzędne.

Materiał i metody

Rozdział Materiały i metody przedstawiony został na 13 stronach maszynopisu i stanowi bardzo szczegółowy opis użytych w doświadczeniach szczepów bakterii i podłoży, procesu laktofermentacji wysłodków buraczanych, dalej analizy chemicznej powstałej biomasy oraz aktywności przeciwrodnikowej i zawartości polifenoli, oznaczania ilości sacharozy i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w uzyskanej biomacie. W podrozdziale 4.1.2 „Proces laktofermentacji wysłodków buraczanych” Autorka pisze, że do zainicjowania fermentacji użyte zostały melasowane wysłodki buraczane „Toffi” w formie pelletu. Generalnie, w żywieniu koni otyłych, z zespołem metabolicznym lub/i insulinoopornością nie używa się melasowanych wysłodków buraczanych, ponieważ stanowią one dodatkowe źródło cukrów i przyczyniają się do pogłębienia dysfunkcji metabolicznych. U koni stosuje się wysłodki buraczane niemelasowane, które stanowią produkt uboczny procesu pozyskiwania cukru z buraków cukrowych, dzięki czemu są praktycznie pozbawione cukru (mniej niż 10% w suchej masie). Są bardzo bogate w włókno, a przy tym ubogie w białko i skrobię. W zasadzie w żywieniu koni w ogóle unika się podawania wysłodków melasowanych i, ze względu na dużą zawartość cukrów (melasa to w 60-70% sacharoza) oraz dostarczanie dużej ilości łatwo strawnej energii, są one polecane do karmienia np. krów wysokowydajnych w szczycie laktacji.

Dalej następuje opis metod zastosowanych przez Autorkę podczas hodowli komórkowych i badań molekularnych i cytobiologicznych. Treść podrozdziału 4.7.1 „Izolacja komórek ASC pochodzących od koni” nasuwa pewne wątpliwości, odnośnie pozyskania komórek macierzystych. Mianowicie Autorka podaje, że pozyskała komórki z Międzynarodowego Instytutu Medycyny Translacyjnej. Jak rozumiem był to gotowy produkt, który został pozyskany i scharakteryzowany pod kątem zawartości komórek macierzystych (*Stem cells*) przez zespół MIMT. Niemniej jednak, poniżej znajduje się opis pozyskiwania komórek tkanki tłuszczowej (adipocytów) z tkanki tłuszczowej konia, w sposób sugerujący, że pracę tę wykonywała Autorka. Nie ma natomiast podanych markerów potwierdzających, że wyizolowane komórki to komórki macierzyste (powszechnie stosowane markery komórek macierzystych tkanki tłuszczowej to CD13, CD29, CD90, CD73, CD105, CD44 i nieobecność CD45 i CD31). Autorka nie załącza również zgody Lokalnej Komisji Etycznej na przeprowadzenie takich badań. Stąd więc moje pytanie, czy opis jest jedynie zaczerpnięty z

zasobów MIMT, wówczas powinno być to podane w tekście oraz na jakiej podstawie, komórki wyizolowane z tkanki tłuszczowej zostały zakwalifikowane jako komórki macierzyste.

W kolejnych podrozdziałach odnoszących się do opisu materiałów i metodyki, Doktorantka opisuje przygotowanie ekstraktów z fermentowanych wysłodków buraczanych oraz opisuje model eksperymentalny, który zastosowała w badaniach. W moim odczuciu warto byłoby w tym miejscu napisać o roli, jaką spełniała inkubacja komórek z tunikamycyną w każdym z eksperymentów. Rolą tunikamycyny było spowodowanie stresu komórkowego, a dokładnie stresu retikulum endoplazmatycznego.

W kolejnych podrozdziałach Autorka szczegółowo opisuje metodykę zastosowaną w badaniach cytobiologicznych i molekularnych, w sposób nie pozostawiający wątpliwości co do właściwego opanowania technik laboratoryjnych. Należy podkreślić, że wielość i zróżnicowanie testów zastosowanych przez Doktorantkę, pozwoliła na otrzymanie kompleksowych wyników przeprowadzonych doświadczeń *in vitro*.

Rozdział „Materiał i metody” kończy podrozdział dotyczący analizy statystycznej, który uważam za prawidłowo przedstawiony.

Wyniki

Wyniki badań zostały przedstawione na 71 stronach maszynopisu, wliczając w to 18 rycin, 6 tabel i 52 wykresy. Wyniki są przedstawione zgodnie z układem doświadczenia. Ilość wyników, podobnie jak ilość wykonanych doświadczeń *in vitro* jest bardzo duża, dlatego na uwagę zasługuje sposób ich prezentacji zarówno opisowy jak i graficzny. Wyniki przedstawione są w sposób czytelny i zrozumiały z uwzględnieniem analizy statystycznej. Niemniej jednak mam pytanie dotyczące wyboru dawek korzystnych stężeń fermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych, jak również odniesienia wybranych przez Autorkę dawek do sytuacji *in vivo*. Bazując na teście żywotności komórek (podrozdział 5.2.1), do dalszych badań Autorka wybrała dawkę 500 ng/ml, ponieważ dawka ta nie działała cytotoksycznie na komórki poddane działaniu ekstraktu z wysłodków wraz ze szczepem probiotycznym *Lactobacillus rhamnosus* (wykres 13). Natomiast w drugim układzie doświadczalnym, w którym komórki były poddane działaniu fermentowanych ekstraktów bez bakterii, Autorka podaje, że również wybrała dawkę 500 ng/ml, ponieważ w wyniku zastosowania tej dawki odnotowano wzrost absorbancji, jednakże na wykresie 14 nie obserwuje się wzrostu absorbancji po stymulacji dawką 500 ng/ml.

Ponadto, z punktu widzenia klinicysty, wybór dawki do stymulacji komórek w hodowlach *in vitro* jest bardzo teoretyczny i trudno znaleźć tu przełożenie na sytuację w żywym organizmie. W przypadku stosowania w hodowlach komórkowych np. steroidowych hormonów płciowych, wiadomo, że 17 β -estradiol występuje w organizmie samicy w stężeniach pikogramowych, natomiast progesteron w nanogramowych. Daje to więc asumpt do wybrania dawki stymulacyjnej, która w mniejszym lub większym stopniu naśladuje sytuację *in vivo*. Czy Autorka może zaproponować wyjaśnienie zastosowanych dawek w swoich doświadczeniach?

Dyskusja

Rozdział „Dyskusja”, zamieszczony na 15 stronach maszynopisu, jest przykładem dobrej analizy uzyskanych wyników i umiejętności ich konfrontacji z wynikami i spostrzeżeniami prezentowanymi przez innych autorów. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością literatury naukowej w temacie swoich badań, która umożliwiła jej przeprowadzenie rzetelnej i obszernej dyskusji w niniejszej rozprawie doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje dobór szerokiego wachlarza metod badawczych, którymi posłużyła się Doktorantka w celu rozwiązania zaproponowanego zagadnienia, jak również trafność wyciąganych wniosków.

Z uwag dotyczących tego rozdziału, poproszę o wyjaśnienie opisu testu wykrywania apoptozy ze strony 125. Czytając ten fragment miałam wrażenie, że aneksyna V służy do różnicowania komórek na żywe i martwe. Natomiast aneksyna V wiąże się do fosfatydyloseryny, która w prawidłowych komórkach zlokalizowana jest po wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej. Wczesny sygnał apoptotyczny to translokacja fosfatydyloseryny na stronę zewnętrzną. Natomiast do różnicowania komórek na żywe i martwe w tym teście służy jodek propidyny, który wnika do wnętrza martwych komórek i barwi kwas nukleinowy. Nie mam uwag dotyczących merytorycznego opracowania rozdziału „Dyskusja”. Natomiast z recenzenckiego obowiązku muszę wspomnieć, że podczas czytania całej pracy zwróciły moją uwagę pewne niedociągnięcia językowe, do których należą głównie błędy literowe (zwykle stosowanie przez Autorkę „e” zamiast „ę”), błędy interpunkcyjne oraz drobne błędy stylistyczne. Zdarzały się również zaczerpnięcia z języka angielskiego np. working solution zamiast roztworu roboczego (podrozdział 4.7.10, strona 40). Tak, jak wspomniałam wcześniej, są to błędy nie umniejszające wartości merytorycznej pracy.

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest unikalną i cenną pozycją ukierunkowaną na próbę wsparcia dietetycznego koni dotkniętych zespołem metabolicznym, będącym zaburzeniem coraz częściej spotykanym w chowie i hodowli koni. Uzyskane w trakcie badań wyniki mogą być pomocne w opracowaniu właściwej diety dla koni dotkniętych EMS, co jest bardzo istotne z klinicznego punktu widzenia. Przeprowadzenie tych badań wymagało opanowania przez Doktorantkę szeregu technik laboratoryjnych, następnie wykonania analiz laboratoryjnych zgromadzonego materiału badawczego, przeprowadzenia statystycznej „obróbki” uzyskanych wyników oraz przygotowania kompleksowej monografii.

Wniosek końcowy

Uważam, że praca doktorska mgr inż. Patrycji Wróblewskiej, pt.: „Laktofermentowane wysłodki buraczane jako czynnik uwrażliwiający na insulinę konie z zespołem metabolicznym EMS”, w mojej ocenie w pełni odpowiada wymogom określonym w art. 187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2023 poz. 742 ze zm.) stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora. Dlatego też przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Patrycji Wróblewskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.



Prof. dr hab. n. wet. Marta Siemieniuch

