

Dr hab. Lidia Mazur

Zakład Hematologii Eksperymentalnej

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Barbary Trzeciak "Wpływ podania *in ovo* kwasu foliowego i metioniny na rozwój oraz wybrane parametry krwi kury domowej (*Gallus gallus domesticus*)" wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Barbary Tombarkiewicz i promotora pomocniczego dr inż. Marcina Lisa.

W celu uzyskiwania jak najlepszych efektów hodowlanych, w wyniku wieloletniej selekcji wyhodowano linie kur mięsnych i nieśnych. Brojlery kurze, jako specjalnie wyselekcjonowane linie *Gallus gallus domesticus* w kierunku szybkiego wzrostu, charakteryzują się znacznie szybszymi przyrostami dobowymi niż kury czysto-rasowe czy kury nieśne. Linia kur mięsnych Ross 308 stanowi jeden z najpopularniejszych typów brojlerów kurzych spotykanych w polskim chowie. Należy podkreślić, że wskaźnik wylęgowości kur linii mięsnych jest jednak niższy w porównaniu ze wskaźnikiem wylęgowości kur linii nieśnych. Szybki wzrost masy ciała obserwowany w czasie rozwoju kur linii mięsnych wiąże się zapewne z zachodzeniem procesów metabolicznych na wyższym poziomie i być może niewystarczającą zawartością substancji odżywczych zmagazynowanych w jajach, koniecznych do prawidłowego rozwoju zarodka w okresie embriogenezy. Hodowcy brojlerów kurzych wciąż poszukują nowych rozwiązań dotyczących zwiększenia wylęgowości kur linii mięsnych. W hodowlach kur dużą wagę przywiązuje się do odpowiedniego odżywiania. Poznanie wpływu składników odżywczych na rozwój i funkcjonowanie organizmu kur linii mięsnych ma ogromne znaczenie. Temat recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Barbary Trzeciak dotyczący wpływu metioniny i kwasu foliowego na rozwój kur linii mięsnej Ross 308 jest więc aktualny, a także bardzo interesujący.

Rozprawa doktorska przedstawiona do recenzji obejmuje 110 stron maszynopisu, 15 rycin, 24 tabele, 12 fotografii z mikroskopu świetlnego oraz 189 pozycji literatury. Doktorantka wyróżniła w swojej rozprawie wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, spis tabel, rycin i fotografii, spis literatury i streszczenie w języku polskim i angielskim.

We „Wstępie“, Doktorantka stwierdziła, że zarodek ptaków stanowi dobry model biologiczny wykorzystywany w badaniach. Podkreśliła znaczenie zawartości substancji odżywczych w jajach dla prawidłowego rozwoju kurcząt. Wskazała, że linie kur mięsnych charakteryzują się zwiększonymi wymaganiami dotyczącymi zawartości substancji odżywczych, sugerując iż suplementacja aminokwasów mogłaby zapobiegać zaburzeniom obserwowanym w okresie rozwoju kurcząt. Następnie, Doktorantka stwierdziła, że metionina jest jednym z aminokwasów stosowanych jako suplement paszy dla drobiu. Podkreśliła także, że przekroczenie odpowiednich dawek metioniny może powodować hyperhomocysteinemię odpowiedzialną za zaburzenie wielu procesów zachodzących w czasie rozwoju i funkcjonowania organizmu, a kwas foliowy może wpływać na obniżenie poziomu homocysteiny.

W świetle opisanych doniesień naukowych, Doktorantka sformułowała ambitny cel pracy. Mając na uwadze poszerzenie wiedzy na temat biologicznego działania metioniny i kwasu foliowego, celem zaplanowanych badań było określenie wpływu tych substancji na przebieg rozwoju kur linii mięsnej Ross 308.

W „Materiałach i metodach“, Doktorantka opisała materiał doświadczalny, który stanowiły kury linii mięsnej Ross 308, określając także warunki inkubacji jaj. Doktorantka wyróżniła 2 etapy badań, w pierwszym etapie – metioninę i/albo kwas foliowy zastosowała w formie iniekcji *in ovo* w 4-tej dobie inkubacji, natomiast w drugim etapie – w 17-tej dobie inkubacji jaj kurzych. Należy podkreślić, iż w czasie wykonywania doświadczeń, Doktorantka zastosowała wiele metod badawczych. Analizowała zawartość aminokwasów w jajach kurzych linii Ross 308, występowanie wad rozwojowych u zarodków, śmiertelność zarodków kurzych, wylęgowość piskląt kurzych, masę ciała kurcząt, masę woreczka żółtkowego, wątroby i serca, zmiany histologiczne zachodzące w trzustce, nerkach i w wątrobie. Przeprowadzała biochemiczne analizy stężenia glukozy we krwi, kwasu moczowego i homocysteiny w osoczu. Określała parametry hematologiczne – liczbę krwinek białych, odsetek limfocytów, eozynofili, bazofili, heterofili i monocytów, liczbę erytrocytów, wskaźniki czerwonekrwinkowe, zawartość hemoglobiny we krwi, wartość hematokrytową. W czasie rozwoju *Gallus gallus domesticus*, Doktorantka dokonywała także pomiarów tempa pracy serca.



Wyniki doświadczeń uzyskanych przez Doktorantkę zostały przedstawione w formie opisowej, czytelnych tabel i wykresów słupkowych, a także fotografii z mikroskopu świetlnego. Należy podkreślić przejrzystą i obszerną dokumentację interesujących wyników badań. Doktorantka wykazała i porównała wpływ metioniny i kwasu foliowego, podawanych *in ovo*, osobno oraz w kombinacjach, zależnych od zastosowanych dawek testowanych substancji, na czasowe zmiany zachodzące w czasie rozwoju kur linii Ross 308 w okresie embriogenezy oraz w okresie od 1-szej doby po wylęgu aż do 35-tej doby odchowu kurcząt. Cenne dane uzyskane przez Doktorantkę w czasie wykonywania kompleksowych badań, wskazują na istotny wpływ metioniny i kwasu foliowego na procesy zachodzące w rozwijającym się organizmie *Gallus gallus domesticus*.

W „Dyskusji”, Doktorantka omówiła uzyskane wyniki, przedstawiając je w świetle badań innych autorów. „Dyskusja”, podobnie zresztą jak „Wstęp” świadczą o znajomości zagadnień związanych z tematyką badań wykonanych przez Doktorantkę. Po „Dyskusji” na podstawie uzyskanych wyników badań, Doktorantka skrótowo przedstawiła wnioski. Literatura, obejmująca w większości prace opublikowane w ostatnich latach, została rozsądnie dobrana. W „Streszczeniu” / „Abstrakcie”, Doktorantka ujęła cel pracy, krótki opis materiału doświadczalnego i metod stosowanych w badaniach oraz zwięzły opis i interpretację uzyskanych wyników badań.

W trakcie czytania rozprawy nasunęły mi się uwagi, a także pytania które wymagają wyjaśnienia :

- „Wstęp” powinien zawierać obszerniejszą wiedzę dotyczącą tematyki związanej z pracą doktorską.
- Doktorantka testowała wpływ metioniny i /albo kwasu foliowego na rozwój kury domowej. Według mnie, Doktorantka nie powinna dokonywać porównań dotyczących rozwoju ptaków i ssaków. Nie zgadzam się ze stwierdzeniem, że - „zarodek ptasi może być z powodzeniem stosowany w badaniach embriologicznych w zastępstwie zarodka ssaczego, w związku z podobieństwem budowy” (str. 4), czy wyjaśnieniem przez Doktorantkę - obniżonego wskaźnika wylęgowości określonego dla kur linii mięsnych, porównując z sytuacją mającą miejsce podczas intensywnego treningu sportowego czyli „... z sytuacją organizmu ludzkiego zmuszanego do nasilania procesów anabolicznych...” (str. 5).
- Dlaczego Doktorantka wspomina o reumatoidalnym zapaleniu stawów u ludzi, pisząc dalej o zwyrodnieniu stawów „u szybko rosnących ras drobiu” (str. 6)

- Cel pracy powinien być precyzyjnie sformułowany ze wskazaniem celów szczegółowych.

- W części pracy „Materiał i metodyka“ istnieje niezgodność liczby jaj użytych w badaniach. Doktorantka podała, iż w doświadczeniach wykorzystwała „łącznie 840 jaj wylęgowych kur linii mięsnej ROSS 308” (str. 10), w tym w pierwszym etapie 275 sztuk jaj (str. 11), a w drugim etapie 560 sztuk jaj (str. 13). W „Streszczeniu“, Doktorantka podała wartość 835 sztuk jaj kurzych (str. 107).

- Schemat analiz wykonywanych w I-szym i II-gim etapie badań – umożliwiłby przedstawienie zaplanowanych doświadczeń w sposób przejrzysty

- Doktorantka nie wyjaśniła na jakiej podstawie wybrała stosowane w doświadczeniach dawki metioniny i kwasu foliowego.

- W opisie metodyki dotyczącej oznaczeń biochemicznych, Doktorantka wskazywała tylko, że analizy były wykonywane zgodnie z instrukcją producenta (str. 17, 18).

- Doktorantka oceniała anomalie rozwojowe, „w tym rodzaje potworkowości“ – nie opisując czym one przejawiały się (str. 16).

- Do wskaźników czerwonokrwinkowych zalicza się z reguły tylko: średnią objętość krwinki czerwonej, średnią masę hemoglobiny w krwince czerwonej, średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej (str. 18; 78).

- Doktorantka nie podała nazwy analizatora hematologicznego (str. 18).

- W części pracy „Wyniki“, Doktorantka nie wyjaśniła co rozumie pod pojęciem „treści jaj kurzych“ (str. 23).

- Nie zostały zaznaczone odchylenia standardowe na 2 wykresach słupkowych (str. 27, ryc. 6; str. 33, ryc. 10).

- Jaka jest zależność między zawartością metioniny oznaczonej w jajach kur linii Ross 308 (str. 24, Tabela 3) a dawkami metioniny zastosowanymi w doświadczeniach przeprowadzonych przez Doktorantkę ?

- Nie wyjaśniono dokładnie oznaczeń wskazujących na występowanie różnic statystycznych pomiędzy wartościami poszczególnych grup doświadczalnych (np. Ryc. 5, str. 25).

- Po zastosowaniu 0.7 % roztworu NaCl w formie iniekcji *in ovo* w 4-tej dobie inkubacji jaj, stwierdzono śmiertelność rozwijających się zarodków wynoszącą 48 %, w odniesieniu do wartości kontrolnej grupy jaj, którym nie podawano roztworu fizjologicznego (str. 25, 26). Jakie są przyczyny tak wysokiej śmiertelności zarodków kurzych, obserwowanej po iniekcji *in ovo* – 250 µl roztworu NaCl ? Przy tak znacznej śmiertelności zarodków określonej po zastosowaniu roztworu soli fizjologicznej, wartości ukazujące śmiertelność zarodków kurzych po iniekcji metioniny i/ lub kwasu foliowego, mogą nie odzwierciedlać w sposób



jednoznaczny działania tych testowanych substancji na rozwój kury w okresie embriogenezy.

- Obserwowane wady rozwojowe (str. 26) powinny być dokładniej opisane i udokumentowane w formie zdjęć.

- Jakie uszkodzenia mechaniczne czy zaburzenia rozwojowe (str. 27) obserwowano w przypadku iniekcji *in ovo* - metioniny i/albo kwasu foliowego, w 17-tej dobie embriogenezy ?

- Opis wyników analiz histologicznych powinien być bardziej szczegółowy, a załączone zdjęcia powinny być w większych rozmiarach (str. 37-42).

- Bardzo wysokie wartości SD obliczono w przypadku analizy liczby leukocytów (str. 48), liczby erytroplastyd (str. 57) i erytrocytów niedojrzałych (str. 58). Doktorantka wykazała także znaczne różnice między minimalnymi i maksymalnymi procentowymi wartościami analizowanych krwinek białych (str. 51). Mając na uwadze duże różnice pomiędzy wartościami analizowanych parametrów, czy określanie korelacji pomiędzy stosowanymi dawkami metioniny i kwasu foliowego oraz poszczególnymi parametrami było słuszne i przyczyniło się do wyciągnięcia właściwych wniosków dotyczących działania testowanych substancji ?

- Podstawowe informacje dotyczące zagadnień związanych z tematem pracy doktorskiej ujęte w „Dyskusji“ powinny być podane we „Wstępie“ – przykładowo: dane opisujące procesy zachodzące w czasie rozwoju kury domowej (str. 62, 64, 66); dane o kwasie foliowym (str. 63-64), metioninie i homocysteinie (str. 68). Wstęp powinien zawierać także informacje na temat hematopoezy zachodzącej u ptaków oraz opis elementów morfotycznych krwi kury domowej.

– Czy stwierdzenie Doktorantki: - „wszystkie procesy zachodzące w organizmie mają odzwierciedlenie w fizjologicznych i biochemicznych parametrach krwi” (str. 74) - jest rzeczywiście zgodne z prawdą ?

- W „Dyskusji“, z reguły nie opisuje się wyników podając otrzymane wartości i wykazując różnice istotne statystycznie (str. 67-69, 71, 74, 76-79, 81).

- Wyróżnienie podrozdziałów we „Wstępie“ i w „Dyskusji“ pozwoliłoby na uporządkowanie przekazywanych przez Doktorantkę danych.

- „Wnioski“ powinny być ujęte w formie zdań twierdzących, a nie przypuszczających. Wniosek nr 1. - nie wynika z badań przeprowadzonych przez Doktorantkę (str. 82).

- W „Spisie Literatury“ istnieje niezgodność literatury cytowanej w tekście pracy i w spisie literatury:

- 2011 czy 2012 rok – str. 14/nr 12;

- brak publikacji w spisie literatury: str. 21/ Brigham, 2002; str. 62/ Trzeciak i inni, 2014; str. 71/ Staburzyńska-Migaj i inni, 2006;

- publikacja dwukrotnie wpisana w spisie literatury: nr. 30 i 31/str. 90;

- W spisie literatury - nie zostały podane strony następujących pozycji literaturowych : nr. 1, 13, 20, 26, 35, 41, 42, 66, 74, 95, 98, 104, 112, 114, 125, 138, 163, 167.

- W „Streszczeniu/ Abstrakcie“ nie uwzględniono wszystkich analizowanych parametrów np. tempa pracy serca określanego w okresie od 10-tego do 21-szego dnia inkubacji jaj. Analizując wartości poszczególnych parametrów określanych w badaniach, Doktorantka powinna wyraźnie podkreślić efekty skojarzonego działania metioniny i kwasu foliowego na rozwój kur linii Ross 308, w odniesieniu do efektów uzyskanych w przypadku pojedynczego zastosowania testowanych substancji.

- „Słowa kluczowe“ – nie obejmują wszystkich słów które powinny być ujęte.

Doktorantka nie ustrzegła się niezręczności językowych czy błędów, na które z obowiązku recenzenta muszę wskazać :

- W „Wykazie skrótów“ – grupy iniekowane...(str. 1-2) - ‚grupa‘ nie może być iniekowana

- grupy iniekowane kwasem foliowym/ metioniną (np. str. 1, 2, 11, 13) – niewłaściwe sformułowanie; ‚grupie‘ nie można podawać testowanych substancji w formie iniekcji

- suplementacja aminokwasami na poziomie embrionalnym (str. 5) – powinno być: w okresie rozwoju embrionalnego

- rozwój pre- i postnatalny (str. 4, 5) – te określenia odnoszą się z reguły do rozwoju ssaków

- liczba hematokrytowa (str. 7) – stosuje się raczej określenia: hematokryt, wskaźnik hematokrytowy

- określenie wpływu różnych dawek metioniny i/lub kwasu foliowego (np. str. 9, 107) – określenie wpływu metioniny i/lub kwasu foliowego zastosowanych w różnych dawkach; nie określa się wpływu dawek, tylko wpływ testowanych substancji zastosowanych w różnych dawkach

- metodą iniekcji (str. 10) - raczej : w formie iniekcji *in ovo*

- badania nad wpływem iniekcji in ovo kwasu foliowego i metioniny... (str. 10) powinno być raczej: badania nad wpływem metioniny i kwasu foliowego podawanych w formie iniekcji *in ovo*

- rozcieńczalnik jako 0.7 % roztwór NaCl (str. 11, 13)

- wybranego roztworu (str. 12, 14) – nieprecyzyjne sformułowanie

- badanie rozmazu (str. 74) – powinno być: analizowanie rozmazu



- oznaczenia poziomu trombocytów (str. 18) – powinno być: liczby trombocytów
- ...przy barwieniu próbki ... (1-linia, str. 19) – jakiej próbki ? - nieprecyzyjny opis
- ...różnice pomiędzy poszczególnymi grupami badano testem Duncana (str. 22) - powinno być : różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi w poszczególnych grupach...
- wszystkie grupy różniły się istotnie od kontroli nieiniekwanej (str. 25) – różnią się między sobą wartości poszczególnych grup, a nie grupy
- odsetek zarodków zmarłych ... był niższy w porównaniu z pozostałymi grupami (str. 25) – nie można konkretnych wartości porównywać z grupami, tylko z wartościami poszczególnych grup
- w grupach iniekwanych metioniną... (str. 28) - nie można iniekwować grupy
- masa ciała piskląt po iniekcji *in ovo* w E4 metioniny i/lub kwasu foliowego (str. 28) – kolejność słów : masa ciała piskląt po iniekcji *in ovo* - metioniny i /lub kwasu foliowego w E4
- masa piskląt w D1 wynosiła 49.8 g i za wyjątkiem grypy M25 była istotnie wyższa od pozostałych (str. 28/29) - powinno być: wartości grupy / wartości pozostałych grup
- ...piskląt iniekwanych najwyższymi dawkami metioniny i metioniny z kwasem foliowym... (str. 37) - piskląt którym podawano w formie iniekcji *in ovo* - metioninę oraz metioninę z kwasem foliowym w najwyższych dawkach
- ...rodzaju podawanej substancji... (str. 38) – raczej: testowanej substancji
- W grupach eksponowanych na czynnik doświadczalny..., ...odsetek zarodków zmarłych bezpośrednio po wykonaniu manipulacji... (str. 62) – Doktorantka powinna precyzyjnie formułować zdania
- Główne różnice w porównaniu do krwi ssaczek to występowanie jądrzastych erytrocytów, dużych jądrzastych trombocytów (prawdopodobnie pochodzenia erytrocytarnego) (str. 74) - brak cytacji
- ...niewiele jest dostępnych informacji na temat hematologii, w szczególności tej dotyczącej piskląt (str. 75) – złe sformułowanie; raczej: niewiele jest dostępnych danych dotyczących krwi i układu krwiotwórczego
- ...ocena parametrów czerwonych. Stanowi ona często podstawę do stwierdzenia nieprawidłowego funkcjonowania układu krwionośnego (str. 78) – Doktorantka popełniła zasadniczy błąd myląc układ krwionośny z układem krwiotwórczym.
- Wzrost liczby erytrocytów jest obserwowany w przypadku odwodnienia ... (str. 78) – nieprecyzyjne sformułowanie; powinno być: Wzrost liczby erytrocytów w jednostce objętości krwi...

- Stężenie hemoglobiny we krwi jest zależne od liczby i wielkości erytrocytów oraz zawartości w nich hemu (str. 81) – niewłaściwe, nieprecyzyjne sformułowanie
- ...hematologia.. (str. 108) – jako ‚słowo kluczowe‘ – nie jest odpowiednie
  - Wyszczególnione skróty nie powinny być stosowane, przykładowo: m. in. (str. 5); kw. foliowego (str. 11, 13);
- ROSS /Ross (str. 5, 24) - nazwa linii kur powinna być jednakowo określana w tekście
  - Doktorantka nie ustrzegła się powtarzania przekazywanych danych:
- W odróżnieniu od ssaczego, embrion ptasi rozwija się poza organizmem matki (str. 4, 62)
- o zawartości aminokwasów w jajku kurzym (str. 4, 62)
- pobieranie narządów do probówek z 4% formaliną (str. 15, 17)
- pole naczyniowe zarodka zawiązuje się już w 24 godz. inkubacji... (str. 62, 71)

Rozprawę doktorską oceniam pozytywnie. Moje uwagi nie umniejszają, co wyraźnie pragnę podkreślić, wartości merytorycznej recenzowanej pracy, którą oceniam wysoko. Moim zdaniem, uzyskane przez Doktorantkę wyniki poszerzają istniejącą wiedzę i wnoszą do niej istotne elementy dotyczące wpływu metioniny i kwasu foliowego, zastosowanych zarówno pojedynczo jak i w kombinacjach, na rozwój i funkcjonowanie organizmu kur linii mięsnej Ross 308. Na szczególne podkreślenie zasługuje podjęcie i wykonanie tych interesujących badań wskazujących, że zastosowanie metioniny i kwasu foliowego, w formie iniekcji *in ovo*, zwłaszcza we wczesnym rozwoju zarodków kurzych, a także w nieodpowiednich dawkach, może prowadzić do zaburzenia procesów fizjologicznych zachodzących w rozwijającym się organizmie kury. Wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę mają nie tylko duże znaczenie poznawcze, ale także wymiar praktyczny, stanowiąc ważne informacje dla hodowców kur.

Uważam, że przedstawiona do oceny wartościowa praca p.t. "Wpływ podania *in ovo* kwasu foliowego i metioniny na rozwój oraz wybrane parametry krwi kury domowej (*Gallus gallus domesticus*)" spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie pani mgr inż. Karoliny Barbary Trzeciak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik  
Zakładu Hematologii Eksperymentalnej  
Uniwersytetu Jagiellońskiego  
*Lidia Mazur*  
dr hab. Lidia Mazur