

Recenzja

Recenzja pracy doktorskiej pt. „Wpływ podania *in ovo* kwasu foliowego i metioniny na rozwój oraz wybrane parametry krwi kury domowej (*Gallus gallus domesticus*)” autorstwa Karoliny Barbary Trzeciak, napisanej pod kierunkiem dr hab. inż. Barbary Tombarkiewicz i dr inż. Marcina Lisa.

Metionina jest aminokwasem, który występuje w niewielkich ilościach w białkach roślinnych i zwierzęcych, lecz jej niedobór jest poważnym czynnikiem ograniczającym wzrost i rozwój tkanek zwierzęcych. Dla wielu zwierząt jest to aminokwas egzogeny. Niektóre gatunki potrafią go syntezować ale nigdy w takich ilościach, które byłyby wystarczające do pełnego pokrycia potrzeb organizmu. Pozostałą część organizm czerpie z pożywienia. Dlatego też odpowiednia zawartość tego aminokwasu w paszach dla zwierząt hodowlanych jest istotnym problemem. Szczególne zainteresowanie budzi suplementowanie metioniną pasz przeznaczonych dla drobiu ponieważ zaobserwowano wyraźne przyspieszenie wzrostu masy ciała u osobników żywionych paszą wzbogaconą w ten aminokwas. Okazało się jednak, że nadmiar metioniny w diecie również może być czynnikiem ograniczającym. Dlatego też niezwykle istotne jest optymalne dostosowanie zawartości metioniny w paszy w stosunku do potrzeb organizmu a także w stosunku do zawartości innych składników odżywczych. Autorka recenzowanej pracy podjęła badania nad oddziaływaniem metioniny podawanej osobno lub wraz z kwasem foliowym na szereg fizjologicznych wskaźników rozwoju drobiu. Metionina i kwas foliowy były podawane *in ovo* w dwóch różnych okresach rozwoju przed wylęciem ptaka, co jest ciekawym i nowatorskim pomysłem.

Praca ma układ klasyczny. Rozpoczyna się wstępem, cel i hipotezy badawcze zostały ujęte w kolejnym osobnym rozdziale, a dalej następują po sobie materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, spis tabel, spis rycin, spis fotografii, wykaz cytowanej literatury, streszczenie w języku polskim i abstrakt w języku angielskim. Autorka zamieściła także wykaz stosowanych w pracy skrótów. Cała praca obejmuje 110 stron tekstu, 12 fotografii, 15 rycin, 24 tabele i 189 cytowanych pozycji literaturowych.

Pierwszy rozdział – „Wstęp” – został napisany na pięciu stronach co w porównaniu do wielkości całego tekstu wydaje się być dość skromną objętością. Lektura tekstu tej części pracy pozostawia pewien niedosyt ponieważ wiele poruszonych tutaj wątków można było rozwinąć. Autorka pisze na przykład, że „SAME [czyli S-adenozyno L-metionina] jest metabolicznym regulatorem wzrostu, a podawana pacjentom z reumatoidalnym zapaleniem stawów wpływa na poprawę ich funkcji.” Dalej można się dowiedzieć, że zwyrodnienie stawów jest istotnym problemem w hodowli drobiu. I to wszystko. Nie wiadomo dlaczego autorka zwróciła uwagę na ten problem. Nie podjęła próby wyjaśnienia mechanizmu dobroczynnego działania metioniny na stawy. Ze wstępu nie wynika także czy podejmuje się jakieś próby suplementacji metioniną u drobiu. W dalszej części tekstu autorka napisała między innymi, że suplementacja metioniną „może mieć pozytywny wpływ na kształtowanie się układu nerwowego”. W tym miejscu również brakuje wyraźnych argumentów, na których autorka oparła swoją opinię. Co więcej nie zostało zacytowane żadne źródło literaturowe. Oczywiście uwagi recenzenta nie oznaczają, że we wstępie zostały popełnione błędy merytoryczne. Chodzi tylko o to, że autorka wykazała się zbyt dużą wstrzeźliwością w zaprezentowaniu posiadanej przez siebie wiedzy. W związku z powyższym w tym miejscu chciałabym zadać doktorantce następujące pytania:

1. Na czym polega dobroczynny wpływ suplementacji pochodną metioniny (SAME) na reumatoidalne zapalenie stawów i czy podejmowane są próby suplementacji u drobiu ze zwyrodnieniem stawów lub czy prowadzone są badania naukowe na ten temat?
2. Jak wpływa suplementacja metioniny na kształtowanie się układu nerwowego w rozwoju zarodkowym?

Pomimo kilku krytycznych uwag uważam, że wstęp należy ocenić pozytywnie. Przede wszystkim dlatego, że w sposób logiczny prowadzi czytelnika do uzasadnienia celowości podjętych badań a tym samym spełnia swoje najważniejsze zadanie.

Cel i hipotezy badawcze logicznie wynikają z informacji podanych we wstępie. Zostały one dobrze i jasno sformułowane.

Rozdział „Materiał i metody” w sposób szczegółowy opisuje wszystkie procedury badawcze. Rozdział ten nie budzi większych zastrzeżeń. Należy natomiast zauważyć, że badania zostały bardzo dobrze zaplanowane, a w ich trakcie wykonano wiele różnorodnych analiz pozwalających na kompleksową ocenę rozwoju zarodka poddanego działaniu

metioniny i kwasu foliowego. Badania przeprowadzono w dwóch etapach. Pierwszy etap badań dotyczył wpływu wczesnego podania (4 doba inkubacji) metioniny i kwasu foliowego na embriogenezę zarodka kurzego. W drugim etapie metioninę i kwas foliowy podano w 17 dobie inkubacji jaj. Odnotowywane były liczba i procentowy udział jaj wylężonych. U zarodków zmarłych przeprowadzono analizę embriopatologiczną. Analizowano stopień resorpcji woreczka żółtkowego i względną masę narządów. Wykonano preparaty histologiczne wątroby, trzustki i nerki. Wykonano analizę składu aminokwasowego jaj. W pełnej krwi piskląt oznaczono stężenie glukozy, natomiast w osoczu krwi zmierzone zostały stężenia homocysteiny i kwasu moczowego. Ponadto przeprowadzono analizy szeregu parametrów morfologicznych krwi i wykonano balistograficzne pomiary pracy serca zarodków. Całkowita liczba jaj wykorzystanych w pierwszym etapie badań wynosiła 275 a w drugim 560. Liczebność poszczególnych grup badawczych wynosiła od 25 do 70 zarodków co z pewnością świadczy o wysokiej wiarygodności uzyskanych wyników. Pomimo tego autorka natrafiła na pewne trudności podczas prowadzenia badań i w trakcie analizy statystycznej. Wysoka śmiertelność zarodków w pierwszej części badań spowodowała znaczne obniżenie liczby „n” w niektórych grupach badawczych. Tak na przykład w grupie M25 można było przebadać 6 piskląt po wylęgu a w grupie M50 tylko 2 osobniki. Autorce udało się jednak rozwiązać ten problem dzięki wprowadzeniu zmian do drugiego etapu badań. Liczba jaj w poszczególnych grupach została zwiększona do $n=70$ a maksymalna dawka metioniny zmniejszona z 50 do 25 mg na jajo. W związku z tym wyniki uzyskane w dwóch uzupełniających się etapach badań dają wiarygodny pod względem statystycznym obraz. Mam również pewną wątpliwość i jednocześnie pytanie do doktorantki:

- w dalszej części pracy dowiadujemy się, że po wylęgu masa samiczek różniła się od masy samców. Dlatego wyniki dotyczące masy ciała kurek i kogutków przedstawiono w pracy osobno. W związku z tym nasuwa się pytanie czy również inne parametry (morfologia krwi, stężenie kwasu moczowego i homocysteiny) nie powinny zostać przeanalizowane z uwzględnieniem podziału na płeć ?

Wyniki badań zostały zaprezentowane w sposób przejrzysty i kreatywny. Zgodnie z powszechnie przyjętą konwencją tekst, tabele, zdjęcia i wykresy prezentujące wyniki nie zawierają powtórzeń, lecz wzajemnie się uzupełniają tworząc pełny i logiczny opis osiągniętych rezultatów. Rozdział opisujący wyniki oceniam bardzo wysoko, ale mam kilka drobnych uwag:

- tytuły podrozdziałów są zbyt długie co utrudnia zrozumienie ich sensu, np. tytuł podrozdziału IV.2. brzmi „Wpływ iniekcji in ovo kwasem foliowym i/lub metioniną na przebieg rozwoju i wyniki lęgu kury domowej”. Zaraz po nim następuje podrozdział IV.2.1. zatytułowany „Przebieg rozwoju i wyniki lęgu kury domowej przy iniekcji in ovo w czwartej dobie inkubacji (E4) kwasem foliowym i/lub metioniną”. Przed ewentualną publikacją należałoby sformułować tytuły podrozdziałów w bardziej przejrzysty sposób,

- na wykresie nr 5 zaznaczono istotności różnic ale nie zamieszczono słupków odchylenia standardowego,

- zaobserwowane embriopatie powinny zostać udokumentowane fotografiami

- według mnie nie było sensu liczenia korelacji między dawką metioniny lub kwasu foliowego a badanymi przez doktorantkę parametrami ponieważ każda z tych substancji była stosowana tylko w trzech dawkach, zatem w trakcie analizy powstałego szeregu dwucechowego liczba par zmiennych również wynosiła 3. To zbyt mało aby przeprowadzić wiarygodne wnioskowanie statystyczne przy pomocy korelacji. Takie podejście nie ma jednak dużego wpływu na wartość pracy gdyż korelacje są uznawane za testy statystyczne o słabej mocy, a autorka wykorzystwała również inne metody statystyczne, w tym analizę wariancji uznawaną z kolei za jeden z najmocniejszych testów statystycznych.

Dyskusja jest znacznie bardziej obszerna niż wstęp. Rozdział ten został napisany bardzo dobrze. Autorka w zręczny sposób połączyła z sobą interpretację uzyskanych wyników w jeden logiczny obraz, a było to zadanie trudne ze względu na dużą ilość przeprowadzonych analiz. Na uznanie zasługuje również bardzo dobry dobór literatury naukowej. Co ważne wnioski zamieszczone po dyskusji w sposób logiczny wynikają z rozumowania zaprezentowanego w dyskusji. Bardzo ważny aspekt praktyczny wniosków. Stwierdzenie ryzyka jakie się wiąże z suplementacją metioniny zarodkom kury oraz wykazanie możliwości przeciwdziałania zaburzeniom homeostazy i rozwoju u zarodków dzięki podaniu kwasu foliowego z pewnością ma dużą wartość dla naukowców pracujących nad zwiększeniem dochodów płynących z hodowli tych ptaków. W szerszym ujęciu przeprowadzone badania i sformułowane wnioski dają podstawę do krytycznego spojrzenia na stosowanie preparatów aminokwasowych u innych zwierząt, a także u człowieka. Lektura dyskusji i wniosków nie pozostawia wątpliwości, że autorka ma dużą wiedzę i stała się specjalistką z zakresu toksykologii i fizjologii rozwoju zwierząt. Nie znaczy to, że dyskusja nie zawiera kilku słabszych punktów, na które z powinności recenzenta chciałbym zwrócić uwagę:

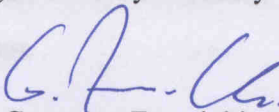
- pewne fragmenty dyskusji powinny być znaleźć się we wstępie. Dotyczy to przede wszystkim opisu morfologicznych cech krwi ptaka i obszernego fragmentu na temat znaczenia badań morfologii krwi dla diagnostyki,

- autorka nie potrzebnie zamieściła w dyskusji wyniki analiz statystycznych. Zostały one przecież umieszczone i omówione w rozdziale wyniki. Tutaj wystarczyło napisać, że pewne różnice były istotne a inne nie lub że korelacje zostały lub nie zostały stwierdzone,

- w dyskusji można znaleźć stwierdzenie, że „płeć ptaka nie ma wpływu na liczbę krwinek białych, co jest zgodne z wynikami badań własnych”. Niestety w recenzowanej pracy nie zamieszczono analizy liczby krwinek białych w zależności od płci. Być może chodzi o jakieś inne badania własne autorki. Jeśli tak to przytoczone stwierdzenie powinno zostać poparte odpowiednią cytacją lub inną informacją o tych badaniach,

W podsumowaniu recenzji chciałbym zwrócić uwagę, że praca została przygotowana niezwykle starannie pod względem edycyjnym i zawiera bardzo małą ilość błędów co jest rzadkością w tego typu dziełach. Badania zostały dobrze zaplanowane, a w trakcie ich przebiegu autorka potrafiła na bieżąco wyciągać wnioski i wprowadzać drobne korekty do procedur badawczych. Dzięki temu powstało wartościowe dzieło oparte na dużej próbie statystycznej i licznych analizach. Na słowa pochwały zasługuje sposób prezentacji wyników, ich interpretacja i wnioski wypływające z badań. Najslabszą częścią pracy jest wstęp. Dostrzegam także pewne mankamenty w prezentacji analiz statystycznych. Uważam jednak, że wymienione przeze mnie niedociągnięcia nie wpływają na wartość pracy i będą łatwe do usunięcia przed publikacją.

W związku powyższym stwierdzam, że praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie mgr Karoliny Barbary Trzeciak do dalszych etapów przewodu doktorskiego


Grzegorz Formicki