



Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Instytut Biologii
Zakład Fizjologii Zwierząt

ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce
Dr hab. Bożena Witek, prof. nadzw. UJK

mail: b.witek@ujk.edu.pl

Kielce, 31. 08. 2015.

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.: „Wpływ stosowania dodatków glukogenicznych na ekspresję genów oraz aktywność enzymów odpowiedzialnych za metabolizm glukozy i tłuszczu w wątrobie krów w okresie okołoporodowym”, wykonanej przez mgr inż. Annę Barteczko w Katedrze Żywienia i Dietetyki Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Zygmunta M. Kowalskiego oraz dra inż. Pawła Górkę, promotora pomocniczego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Anny Barteczko porusza niezwykle ważny z punktu widzenia hodowców problem związany z zaburzeniami metabolicznymi w okresie okołoporodowym u bydła, który obejmuje ostatnie tygodnie okresu zasuszenia i pierwsze tygodnie po porodzie, do osiągnięcia szczytu laktacji. Szczególnie krytyczny jest okres przejściowy, obejmujący ostatnie 3 tygodnie ciąży, wycielenie oraz pierwsze 3-4 tygodnie laktacji. W tym czasie odbywają się wszystkie najistotniejsze w produkcji mleka oraz w rozrodzie procesy i zmiany, które w decydującym stopniu wpływają na dostosowanie się organizmu do nowych warunków, w szczególności do sposobu gospodarowania energią.

W dobrze pojętym interesie hodowcy bydła, warunkiem uzyskania wysokiej wydajności mleka w okresie kolejnej laktacji ale także minimalizacji zaburzeń metabolicznych i zaburzeń rozrodu, jest zapewnienie zwierzęciu, właśnie w okresie okołoporodowym odpowiedniego statusu metabolicznego, co przekłada się na odpowiednią ilość i jakość przyjmowanego pokarmu, uwzględniającego wystarczający poziom czynnego biologicznie białka, witamin i substancji mineralnych ale przede wszystkim odpowiednią wartość energetyczną.

Zaproponowany przez Doktorantkę eksperyment miał na celu poznanie wpływu glicerolu i glikolu propylenowego, na aktywność modelowych enzymów procesu

glukoneogenezy oraz na ekspresję genów związanych z metabolizmem glukozy i tłuszczu w wątrobie krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej w okresie okołoporodowym. Obie te substancje są dość powszechnie stosowane przez hodowców bydła, w celu unikania ujemnego bilansu energetycznego, w odpowiedzi na zaobserwowany niski poziom białka w mleku lub wysoki poziom ciał ketonowych w moczu.

W tym kontekście tematykę rozprawy doktorskiej należy uznać za przedsięwzięcie bardzo celowe i w pełni uzasadnione, bo mimo wydawałoby się dostatecznej wiedzy na ten temat, nawet najlepsi hodowcy bydła borykają się z takimi problemami.

Eksperyment przeprowadzono na 30 krowach rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, pochodzących z hodowli Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, podzielonych na pięć grup, w ramach których poszczególne osobniki otrzymywały doprzelykowe wlewy, odpowiednio: 1 grupa [woda, w objętości 450 ml/dzień], 2 i 3 grupa [glicerol, 450 ml i 900 ml], 4 i 5 grupa [glikol propylenowy, 450 ml i 900 ml]. Doświadczeniem objęto osobniki od 21 dnia przed spodziewanym porodem do 28 dnia po wycieleniu. W części pracy *Material i metody* szczegółowo opisano metody pomiaru indywidualnego spożycia paszy, chemiczny skład pasz, metodykę oznaczania suchej masy, popiołu surowego, białka ogólnego w próbkach pasz oraz masę i skład chemiczny niedojadów. Dalej opisano sposób pozyskiwania materiału biologicznego do analiz – krwi i tkanki wątrobowej. Warunki eksperymentu zostały zaakceptowane przez 1. Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie czy w Warszawie? [zezwoleń NO. 99/2009] a praca wykonana w ramach projektu badawczego nr N N311 632438 finansowanego przez MNiSW.

Krew do analiz pobierano z żyły jarzmowej dwukrotnie – 15 minut przed oraz 45 minut po wlewie dodatku, w 7 dniu przed przewidywanym porodem oraz w 3 i 21 dniu po porodzie. W uzyskanym osoczu oznaczano stężenie glukozy, kwasu β -hydroksymasłowego i triacylogliceroli. W surowicy oznaczano zawartość wolnych kwasów tłuszczowych i stężenie insuliny. Stężenie kwasu β -hydroksymasłowego, wolnych kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli oznaczano jedynie przed wlewem dodatku a stężenie glukozy i insuliny, zarówno przed jak i po wlewie.

Biopsję wątroby wykonywano w 1-szej i 2 godzinie po wlewie wody lub dodatku, w 7 dniu przed spodziewanym wycieleniem oraz w 3 i 21 dniu po porodzie. W supernatantach wątroby oznaczano aktywność karboksylazy pirogronianowej [PC] i karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej [PEPCK-C, cytoplazmatycznej] i [PEPCK-M, mitochondrialnej].

Analizowano również ekspresję genów – karboksylazy pirogronianowej, karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej, apolipoproteiny B100 i mikrosomalnego białka transportującego triacyloglicerole [MTTP].

Autorka wykazała się wielką pracowitością przede wszystkim w odniesieniu do samego układu doświadczenia, które zostało w sposób przemyślany interesująco skonstruowane, na odpowiednio dobranym i zweryfikowanym materiale zwierzęcym. Cel pracy został w pełni zrealizowany zarówno w układzie laboratoryjnym jak i statystycznym oraz udokumentowany w postaci tabel i wykresów. Na uznanie zasługuje wnikliwie przeprowadzona dyskusja wyników. Rozdział ten świadczy o wszechstronnej wiedzy Doktorantki i dobrym Jej przygotowaniu do realizacji omawianych zadań badawczych.

W pracy szczegółowo opisano metody i procedury pozyskiwania krwi oraz supernatantu z tkanki wątrobowej do analiz enzymatycznych oraz procedury związane z analizą ekspresji genów – karboksylazy pirogronianowej, karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej, apo B100 oraz mikrosomalnego białka transportującego triacyloglicerole.

Oznaczanie aktywności karboksylazy pirogronianowej i karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej przeprowadzono w Leibniz Institute for Farm Animal Biology w Dummerstorf w Niemczech, wykorzystując metodę izotopowego znakowania produktów w reakcji enzymatycznej. Analiza ekspresji genów obejmowała izolację całkowitego RNA, reakcję odwrotnej transkrypcji [termocykler 2720 Thermal Cycler; Applied Biosystems, Massachusetts, USA] oraz amplifikację fragmentów analizowanych genów przy zastosowaniu metody *Real-time PCR* [termocykler Real-time PCR System, Step One Plus, Applied Biosystem, USA].

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, stosując procedurę MIXED pakietu statystycznego SAS [2002]. Przed przystąpieniem do analizy statystycznej, wyniki testowano pod względem normalności rozkładu danych. Dla pomiarów powtarzalnych, model statystyczny uwzględniał jako zmienne klasyfikujące – efekt grupy, dzień pomiaru, czas pobrania próbki w stosunku do wlewu dodatku oraz trójczynnika interakcję pomiędzy tymi efektami. Ostatecznie, wyniki dla czasu pobrania próbki w stosunku do wlewu dodatku analizowano oddzielnie, ponieważ pomiędzy tymi czynnikami nie wykazano interakcji. Interpretację wyników przeprowadzono przy zastosowaniu procedury CONTRAST, w oparciu o zaplanowane kontrasty – efekt dodatku paszowego i efekt dnia pomiaru.

Wyniki eksperymentu Doktorantka przeanalizowała na tle specjalistycznej, adekwatnie cytowanej literatury w liczbie 161 pozycji [w tym 32 po 2010 roku]. W tekście pracy znalazłam jedynie jedną niezgodność cytowanej pozycji [w tekście jest Bergman i Heitman, 1978, w spisie Bergman i Heitmann, 1978], podobnie w spisie literatury [nieprawidłowa kolejność White i wsp., 2011, 2012ab, str. 107], co świadczy o wielkiej dbałości i staranności w przygotowaniu i zestawieniu literatury. Tak zestawione piśmiennictwo pozwala na przegląd dokonań w dziedzinie wiedzy będącej przedmiotem zainteresowań Doktorantki, choć można zauważyć, że na 161 wykazanych pozycji aż 69 [prawie 43%], to artykuły z Journal of Dairy Science?

Uzyskane wyniki pozwoliły Doktorantce na sformułowanie następujących wniosków: 1/ glicerol i glikol propylenowy miały istotny wpływ na proces glukoneogenezy w wątrobie krów, w tym na ekspresję genów i aktywność enzymów tego procesu; 2/ glikol propylenowy okazał się mniej efektywnym substratem glukoneogenezy niż glicerol, wobec tego, jego zastosowanie wymaga nie tylko wyższych aktywności karboksylazy pirogronianowej i karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej ale też większej ekspresji genów kodujących syntezę tych enzymów w wątrobie; 3/ glicerol i glikol propylenowy miały wpływ na ekspresję genów kodujących syntezę apo B100; mniejsze ich dawki zwiększały ekspresję genu apo B100 a niezależnie od wielkości dawki, obydwa dodatki zwiększały ekspresję genu kodującego mikrosomalne białko transportujące triacyloglicerole; 4/ obserwowane zmiany w aktywności kluczowych enzymów procesu glukoneogenezy [karboksylazy pirogronianowej i karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej] oraz ekspresji wybranych genów w poszczególnych dniach okresu okołoporodowego są wynikiem zmian metabolizmu glukozy i tłuszczu.

Ten ostatni wniosek, wydaje się szczególnie cennym z punktu widzenia hodowcy, bo przecież zakres i tempo zmian metabolicznych, szczególnie w okresie okołoporodowym u krowy świadczy o jej indywidualnych możliwościach adaptacyjnych w odpowiedzi na zmiany zachodzące w jej organizmie w związku z porodem i rozpoczęciem laktacji.

Uwagi dotyczące pracy:

1/ Lekturę tekstu pracy utrudnia umieszczenie tabel z danymi metodycznymi na końcu pracy. Lektura tej części pracy wymaga skupienia a czytelnik co chwilę odsyłany jest do zestawień informujących o składzie dawek pokarmowych, układzie doświadczenia, składzie mieszanin reakcyjnych – kilka razy. Zestawień takich jest 15, więc tyle razy należy przerwać czytanie i znaleźć odniesienie tekstu do właściwej tabeli. Analogicznie tabele oraz wykresy z

uzyskanymi wynikami – dla wygody ich weryfikacji – powinny znaleźć się pomiędzy treściami interpretującymi dane; 2/ W części pracy *Wykaz skrótów użytych w tekście* obserwuje się nieład, ponieważ nie zawsze rozwinięcie skrótów, chociaż merytorycznie poprawne jest adekwatne z ich „zawartością polską lub angielską”, np. BHBA – kwas β -hydroksymasłowy [ang. *β -hydroxybutyric acid*]; DEPC – dietylopirowęglań [ang. *diethyl pyrocarbonate*]. Jeśli w wykazie znajduje się skrót WKT, to dlaczego konsekwentnie nie podano skrótu TP [temperatura pokojowa] a jest RT? W literaturze stosuje się skrót ER dla określenia retikulum endoplazmatycznego oraz rER dla określenia retikulum endoplazmatycznego szorstkiego; 3/ W tabelach 16 i 17, jako jednostkę poziomu insuliny zamiast IU/ml błędnie napisano uIU/ml; 4/nie wyjaśniono zasady działania poidła systemu RIC [czy jest analogiczna jak dla stanowisk żywieniowych systemu RIC?]; 5/Nie wyjaśniono skrótu TMR [*Total Mixed Ration*, mieszanina pasz objętościowych, stosowana w systemie pełnoporcjowego żywienia krów mlecznych, analogicznie TMRz i TMR1? 6/ Przy podawaniu RCF, można było podać wymiary promienia rotora lub dodatkowo RPM/minutę. Zauważone uchybienia, nie umniejszają wysokiej wartości i oceny merytorycznej pracy.

Biorąc pod uwagę całość przeprowadzonego eksperymentu, jego staranne zaplanowanie, sformułowanie hipotez badawczych, odpowiednio dobrane metody badawcze, pracochłonne analizy laboratoryjne, kompetentną analizę i interpretację uzyskanych wyników, dyskusję rezultatów oraz prawidłowo sformułowane wnioski wnoszące nowość interpretacyjną do literatury przedmiotu, uważam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja doktorska Pani mgr inż. Anny Barteczko pt. „Wpływ stosowania dodatków glukogenicznych na ekspresję genów oraz aktywność enzymów odpowiedzialnych za metabolizm glukozy i tłuszczu w wątrobie krów w okresie okołoporodowym” spełnia wszystkie wymagania stawiane dysertacjom doktorskim.

Z tą pozytywną opinią, zwracam się do Pana Dziekana i Wysokiej Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o przyjęcie jej i dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Bożena Witek, prof. nadzw. UJK

Kielce, 31 sierpnia 2015 r.