

Poznań, 10. września 2015 r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Anny Barteczko zatytułowanej :

„Wpływ stosowania dodatków glukogenicznych na ekspresję genów oraz aktywność enzymów odpowiedzialnych za metabolizm glukozy i tłuszczu w wątrobie krów w okresie okołoporodowym” wykonanej w Katedrze Żywienia i Dietetyki Zwierząt na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

Opis formalnej strony pracy

Rozprawa doktorska liczy 130 stron maszynopisu, podzielona jest na następujące rozdziały: wstęp, hipoteza badawcza i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie i literatura. Częścią składową pracy są również: 23 tabele, 14 wykresów i spis treści. Praca jest bardzo starannie opracowana od strony graficznej. Autorka używa poprawnego języka naukowego, pisząc jednocześnie w sposób zrozumiały dla czytającego.

Opis merytorycznej strony dysertacji

Podjęcie wybranej przez Autorkę tematyki, ze względu na szybki postęp w hodowli bydła mlecznego skierowany przede wszystkim na cechy produkcyjne: wydajność i skład chemiczny mleka, jest w pełni uzasadnione. Ujemny bilans energii krów mlecznych w okresie przejściowym spowodowany produkcją mleka rosnącą szybciej od pobrania suchej masy jest jedną z podstawowych przyczyn pogorszenia płodności, chorób metabolicznych, co prowadzi do skrócenia ich użytkowania. Wpływa to również negatywnie na opłacalność produkcji mleka. Dodatki glukogeniczne stosowane od kilkudziesięciu lat w praktyce zootechnicznej zwiększają pulę glukozy i ograniczają uruchomienie rezerw tłuszczu zapasowego mogą ograniczyć skutki głębokiego deficytu energii w pierwszych tygodniach laktacji. Stosowanie glicerolu i glikolu propylenowego jest przedmiotem badań w wiodących ośrodkach naukowych, a ich celem jest między innymi doprecyzowanie dobowych dawek oraz metody i formy ich aplikacji. W tym kontekście podjęcie przez Autorkę próby określenia wpływu dodatków glukogenicznych na procesy biochemiczne zachodzące w wątrobie przy zastosowaniu nowoczesnych metod badawczych obejmujących między innymi: określenie ekspresji wybranych genów oraz aktywności enzymów na metabolizm glukozy i tłuszczu w wątrobie krów należy uznać za nowatorskie, bardzo interesujące zarówno z naukowego jak i utylitarne punktu widzenia.

Tytuł pracy w pełni odzwierciedla jej tematykę.

Doktorantka we **wstępie** pracy opierając się na bogatym piśmiennictwie wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z okresem okołoporodowym krów mlecznych, umiejętnie podkreślając przyczyny i skutki ujemnego bilansu energii. W ciekawie napisanym wstępie znajdziemy również szerokie omówienie przebiegu procesu glukoneogenezy i metabolizmu wolnych kwasów tłuszczowych w wątrobie krów mlecznych i bardzo dużo informacji na temat dotąd mniej poznanego zagadnienia jakim jest ekspresja mRNA oraz aktywności kluczowych enzymów karboksylazy pirogronianowej oraz karboksylazy fosfoenolopirogronianowej regulujących dostępność substratów do endogennej produkcji glukozy w wątrobie krów w okresie okołoporodowym.

Również w tej części dysertacji podkreślono znaczenie apolipoproteiny B 100 i mikrosomalnego białka transportującego triacylglicerole (MTTP) na przemiany lipidów w wątrobie, podkreślając ich znaczenie w syntezie VLDL. W ostatniej części tego rozdziału Doktorantka omawia różne aspekty stosowania glicerolu i glikolu w okresie okołoporodowym, podkreśla zróżnicowanie wcześniej uzyskanych

wyników przez innych autorów. Autorka wskazuje na konieczność wyjaśnienia mechanizmów zmian zachodzących w wątrobie po podaniu dodatku substancji glukogennych. Dobór piśmiennictwa do przygotowania tego rozdziału oparty został na najnowszych anglojęzycznych publikacjach. Rozdział ten ze względu na aktualność tematyki warto byłoby opublikować w formie pracy przeglądowej.

Hipoteza badawcza i cel pracy w następnym rozdziale zostały sformułowane w sposób dokładny i zrozumiały.

W rozdziale **materiał i metody** bardzo precyzyjnie scharakteryzowano układ doświadczenia, metody oznaczania ekspresji wybranych genów i aktywności enzymów związanych z metabolizmem tłuszczu i glukozy w wątrobie oraz analizę statystyczną. Zaproponowany przez Autorkę kompleksowy, przejrzysty, logiczny układ badań pozwolił na zweryfikowanie hipotezy badawczej i realizację celu badań.

Wykonano jedno doświadczenie na 30-tu krowach pierwsiastkach, które podzielono na 5 grup doświadczalnych. Badaniami objęto okres przejściowy od 21dnia przed wycieleniem do 28 dnia laktacji.

Moim zdaniem charakterystyka zwierząt biorących udział w tak precyzyjnych badaniach jest niewystarczająca, szczególnie informacja o średniej wydajności stada z jakiego pochodziły pierwsiastki ma w tego rodzaju badaniach kluczowe znaczenie.

W tej części pracy brakuje również precyzyjnej informacji o kondycji krów BCS, na początku doświadczenia, w dniu wycielenia i w ostatnim dniu obserwacji. Autorka w kolejnych rozdziałach dysertacji podkreśla znaczenie tego właśnie parametru chowu na metabolizm glukozy i lipidów w wątrobie, standardowo monitorowanego w wielu stadach krów.

Czy rozważano poszerzenie badań o grupę otrzymującą doprzelykowo 900 ml wody albo „kontrolną” bez dodatku wody?

Szkoda, że wyniki „związane z wydajnością i składem mleka krów” jak pisze Autorka w tym rozdziale, zostały omówione w innej publikacji. Zamieszczenie wyników tzw. produkcyjnych pozwoliłoby na oszacowanie bilansu energii, a to z kolei ułatwiłoby przeprowadzenie dyskusji bardzo interesujących rezultatów.

Na szczególne wyróżnienie zasługuje zastosowanie nowoczesnych metod badawczych (biopsja tkanki wątroby) oraz metod analitycznych do których należy zaliczyć: analizę aktywności enzymatycznej PC i PEPCK, analizę ekspresji mRNA PC, PEPCK-C i PEPCK-M oraz apo B100, i MTP. Wymienione metody stosowane są przez wiodące na świecie laboratoria badawcze. Należy w tym miejscu również podkreślić współpracę z zespołem dr Hammona z Leibniz Institute for Farm Animal Biology w Dummerdorf, w Niemczech gdzie Doktorantka wykonała analizę aktywności enzymatycznej PC i PEPCK.

Jeżeli rozprawa doktorska ma być wstępem do dalszej pracy naukowej, umiejętności nabyte przez Doktorantkę w trakcie realizacji pracy będą owocowały w przyszłości.

Rozdział **wyniki** napisano zwięźle, pozwala na szczegółową analizę wyników jest stosowany w pracach o nowoczesnym kształcie i układzie. Oceniam to bardzo pozytywnie. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka skoncentrowała się na najważniejszych wynikach i w treści tego rozdziału nie powtarzała danych zamieszczonych w tabelach i wykresach.

W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano szereg interesujących wyników o dużej wartości poznawczej do których można zaliczyć wykazanie, że:

- wlew doprzelykowy obu dodatków zwiększył stężenie glukozy i insuliny w osoczu krwi i jednocześnie nie miał istotnego wpływu na koncentrację WKT

- większe dawki glicerolu i glikolu propylenowego (900ml/szt) spowodowały zmniejszenie pobrania suchej masy po porodzie

- badane dodatki mają działanie glukogeniczne i antyketogenne, a ich stosowanie w okresie okołoporodowym poprawiając status energetyczny krów może zmniejszyć ryzyko wystąpienia zaburzeń zdrowotnych charakterystycznych dla tego okresu

- zmiany aktywności kluczowych enzymów i ekspresji genów PC, PEPCK-C, PEPCK-M, apo B100 oraz MTTP jako efekt wlewów doprężoykowych obu dodatków potwierdziły ich pozytywny wpływ na procesy glukoneogenezy oraz syntezy VLDL w wątrobie
-glicerol jest bardziej efektywnym dodatkiem glukogenicznym od glikolu ponieważ jego wykorzystanie w procesie glukoneogenezy wymaga mniejszego zaangażowania enzymów PC i PEPCK

W rozdziale **dyskusja** mgr inż. Anna Barteczko umiejętnie skonfrontowała uzyskane wyniki z rezultatami innych autorów, co potwierdza Jej bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu. Chociaż ustosunkowanie się do obszernego materiału badawczego nie jest łatwe, dyskusja Autorki jest dojrzała. Świadczy to o jej wiedzy i dobrym przygotowaniu merytorycznym. Na szczególne wyróżnienie zasługuje podjęcie próby odpowiedzi na najtrudniejsze dla badacza pytanie -dlaczego? W dyskusji Doktorantka w zdecydowanej większości podrozdziałów podejmuje próbę wytłumaczenia uzyskanych wyników precyzyjnie analizując procesy biochemiczne i za każdym razem wskazując na prawdopodobne „mode of action”. Natomiast te z wyników, które są trudne do wytłumaczenia, świadczą o złożoności zagadnienia i mogą być inspiracją do dalszych badań w tym zakresie.

Interesująca z punktu widzenia recenzenta –czego nie zamieszczono w pracy- byłaby opinia Autorki dysertacji na temat wpływu mniejszego dobowego pobrania suchej masy (o ponad 2.0kg/szt) w grupach otrzymujących większy dodatek badanych substancji glukogenicznych na status energetyczny i interpretację uzyskanych wyników w tym kontekście. Zmniejszone pobranie suchej masy, ograniczyło również spożycie skrobi o ponad 800g/szt- podstawowego prekursora fermentacji propionowej, co jak można przypuszczać nie było obojętne dla przebiegu glukoneogenezy w wątrobie. Czy największa koncentracja najlepszego biomarkera statusu energetycznego krowy po wycieleniu – wolnych kwasów tłuszczowych we krwi stwierdzona w tych grupach, nie wynikała przede wszystkim ze zmniejszonego pobrania suchej masy?

Moim zdaniem głębszej analizy, komentarza i wskazania ewentualnych przyczyn, wymaga również niestandardowe bardzo małe pobranie suchej masy we wszystkich grupach podczas laktacji.

Czy monitorowano stan zdrowia, temperaturę, przypadki chorób metabolicznych?

Dlaczego krowy po porodzie otrzymywały dawkę kompletną TMR o wartości pokarmowej odbiegającej od rekomendowanych dla tego okresu (fresh)?

Dysertację kończą cztery właściwie sformułowane **wnioski**, adekwatne do uzyskanych wyników.

Pomimo tego, że badania mają przede wszystkim wartość poznawczą to proponuję uzupełnienie tego rozdziału o wniosek o charakterze praktycznym dotyczący jednoznacznie negatywnego wpływu większych dawek badanych dodatków glukogenicznych na pobranie suchej masy w laktacji.

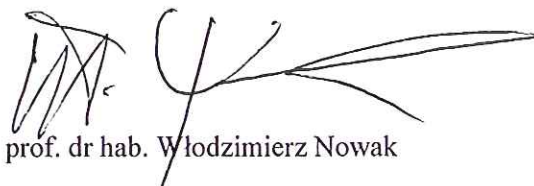
Proponuję również rozważyć zarekomendowanie optymalnej dawki glicerolu i glikolu.

Reasumując, uważam, że oceniana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Barteczko stanowi interesujące samodzielne rozwiązanie problemu naukowego, a prezentacja redakcyjna wyników przeprowadzonych badań jest również dowodem umiejętności Autorki do prowadzenia pracy naukowej. Dysertacja jest źródłem cennych danych odnośnie przemian biochemicznych w wątrobie krów w okresie okołoporodowym otrzymujących dodatki glukogeniczne w formie wlewu doprężoykowego. Na szczególne wyróżnienie zasługują opanowanie i zastosowanie przez Doktorantkę najnowocześniejszych metod i technik badawczych i profesjonalna dyskusja wyników.

Wykonane badania świadczą o Jej pracowitości, odważnym podejmowaniu trudnej, nowatorskiej tematyki badawczej i wielkim zaangażowaniu w poszukiwaniu najwłaściwszych rozwiązań często skomplikowanych zagadnień badawczych. Mam nadzieję, że wyniki zostaną wkrótce opublikowane w prestiżowych czasopismach naukowych.

Wniosek

W związku z powyżej przedstawioną wysoce pozytywną opinią, stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Anny Barteczko w pełni spełnia wymagania i określone w ustawie o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z dnia 14. marca 2003 roku. Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie o przyjęcie pracy i dopuszczenie mgr inż. Anny Barteczko do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jednocześnie ze względu na zastosowanie najnowocześniejszych, multidyscyplinarnych technik i metod badawczych oraz dużą wartość naukową dysertacji wnoszę o jej wyróżnienie.



prof. dr hab. Włodzimierz Nowak

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu