Prof. dr hab. Chandra S. Pareek

Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń
email: pareekcs@umk.pl
Kom: +48-605161800

Recenzja pracy doktorskiej

lek. wet. Karolina Tatarczak

pt. Wpływ seleninotriglicerydów na status zdrowotny i ekspresję wybranych genów kodujących enzymy uczestniczące w procesach antyoksydacyjnych u małych przeżuwaczy.

Wykonana w Katedrze Chorób Wewnętrznych z Kliniką

Pod kierunkiem promotora: **Prof. dr hab. Przemysława Sobiecha**

oraz promotora pomocniczego: **Dr Dawida Tobolskiego**

1. **Podstawa formalna recenzji (uchwala Rady Dyscypliny):**

Przedstawiona do oceny rozprawa **lek. wet. Karoliny Tatarczak** dotyczy badań, opisujących wpływ seleninotriglicerydów na status zdrowotny i ekspresję wybranych genów kodujących enzymy uczestniczące w procesach antyoksydacyjnych u małych przeżuwaczy. Praca stanowi monografię liczącą 104 obejmującą : 3 stronicowe Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wstęp – 14 str , Cel i założenia pracy – 1 str , Materiał i metody – 10, Wyniki – 37, Dyskusje – 9 , Wnioski . oraz Piśmiennictwo 221 pozycji literaturowych

Stwierdzam, że monografia opisująca osiągnięcie naukowe **lek. wet. Karoliny Tatarczak** względem formalnym i merytorycznym, spełnia wymagania zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z

dnia 1 września 2011 roku stawiane osobom ubiegającym się o stopień doktora nauk weterynarii.

2. Ogólna charakterystyka rozprawy, problem naukowy, jego sformułowanie i aktualność podjętego zagadnienia naukowego:

Selen (Se) jest niezbędnym pierwiastkiem śladowym, który jest włączany kotranslacyjnie do łańcucha polipeptydowego jako część aminokwasu selenocysteiny (Sec). Białka zawierające Sec w swoim łańcuchu polipeptydowym są definiowane jako selenoproteiny i występują we wszystkich liniach życia (archeonów, bakterii i eukariotów), jednak niektóre organizmy nie mają zdolności do syntetyzują selenoproteiny . Selenoproteiny mają kluczowe znaczenie dla optymalnego zdrowia ludzi i zwierząt, głównie ze względu na ich działanie przeciwutleniające. Mają działanie przeciwzapalne, chemoprofilaktyczne, przeciwwirusowe i wiążą się z poprawą odpowiedzi immunologicznych . Do prozdrowotnych właściwości selenoprotein zalicza się m.in. ochronę przed nowotworami, prawidłową pracę tarczycy oraz ochronę przed chorobami układu krążenia i mięśniami; jednakże rola suplementacji selenem w chorobach tarczycy jest nadal przedmiotem dyskusji. Niedobór selenu (Se) zmniejsza wydajność mleczną i powoduje niedobór odporności, a przez to zwiększa podatność na choroby, w tym schorzenia gruczołu sutkowego u krów mlecznych . Dlatego suplementacja Se w diecie zwierząt jest wymagane, zwłaszcza w krajach, w których gleby są ubogie w ten pierwiastek śladowy [FAO/WHO, 2004]. Obecnie Se może być dodawany do diet przeżuwaczy w formie nieorganicznej (selenian i selenian sodu) lub w formie organicznej (drożdże selenizowane, zawierające 54–90% Se związany z metioniną) Istnieją prace dotyczące wpływu suplementacji drożdżami Se na zdrowie jego stężenie w mleku, krwi, niektórych narządach lub tkankach. Selen może modulować szerokie spektrum kluczowych procesów biologicznych, w tym odpowiedź komórkową na stres oksydacyjny, sygnalizację redoks, różnicowanie komórkowe, odpowiedź immunologiczną i zwijanie białek. Seleninotriglicerydy, stanowiących związki zawierające selen na +4 stopniu utlenienia. Wyniki dotychczasowych badań in vitro i in vivo wskazują na

silne właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne, neuro-protekcyjne i antymutagenne co czyni je związkami o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych. Przedstawiona przez Autorkę praca wpisuje się w aktualny nurt badań dotyczący suplementacji selenu celem zapobiegania często występującemu niedoborowi w hodowli owiec i kóz a co za tym idzie przeciwdziałania niepożądanym zaburzeniom zdrowotnym u tych zwierząt.

3. Cel rozprawy:

Celem pracy było wykonanie badań opierających się na suplementacji jagniąt i koźląt roztworem seleninotriglicerydów, oraz ocena jej wpływu na status zdrowotny zwierząt na podstawie parametrów hematologicznych, aktywności wybranych enzymów, oceny histopatologicznej wybranych próbek mięśni szkieletowych oraz mięśni serca, jak też oceny poziomu ekspresji wybranych genów uczestniczących w procesach antyoksydacyjnych w tych że mięśniach. Doktorantka w sposób właściwy zdefiniowała podstawowe cele naukowe jak też precyzyjnie określiła cele szczegółowe przedmiotowych badań.

4. Ocena znajomości literatury dotyczącej problematyki badan: W prezentowanej monografii Autorka wykazała się szeroką znajomością literatury tematycznie związanej z podjętym przez nią zagadnieniem badawczym przedstawiając adekwatne odniesienia do 221 pozycji literaturowych.

5. Poprawności i oryginalnie metodyczna oraz zakres rozwiązania zagadnienia naukowego:

Materiałem do badań w prezentowanej przez Doktorantkę pracy było 12 jagniąt rasy kamienieckiej i 12 koźląt rasy alpejskiej, w wieku 10 dni, suplementowanych 2% roztworem seleninotriglicerydów w dawce 0,5 mg na kg masy ciała. W pracy W trakcie doświadczenia pobierano krew w odstępach tygodniowych do 30 dnia życia. Następnie zwierzęta zostały poddane eutanazji. Całość badań była przeprowadzona zgodnie z zasadami dotyczącymi badań na zwierzętach co zostało potwierdzone stosowną zgodą komisji etycznej: Uchwała 28/2021 z dnia 21.04.2021 r.

Autorka przeprowadziła analizy hematologiczne obejmujące poziom hemoglobiny, liczbę hematokrytową, liczbę krwinek czerwonych i białych oraz wskaźniki czerwonokrwinkowe (MCV, MCH i MCHC) oraz oznaczono stężenie glukozy (GLUC), albumin (Alb), białka całkowitego (TP), kreatyniny (Crea), mocznika (Urea), aminotransferazy asparaginianowej (AST), fosfatazy zasadowej (ALP), gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy. Oznaczono także stężenie selenu (Se) w surowicy krwi u wszystkich zwierząt. Określiła również aktywność peroksydazy glutationowej (GPX) oraz dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). W próbkach mięśni wykonano analizy histopatologiczne.

Doktorantka ponadto przeprowadziła analizą ekspresji genów *GPX1* i *SOD1* w próbkach pochodzących z mięśnia dwugłowego uda (*m.biceps femoris*) m. najdłuższego grzbietu (*m. longisimus dorsi*), i mięśnia sercowego oraz wątroby. W analizach ekspresji genów zastosowano opracowane przez autorkę sekwencje starterowe natomiast stosowne geny referencyjne wybrano na podstawie publikacji. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem adekwatnych do tego rodzaju danych testów nieparametrycznych U Manna-Whitneya z zastosowaniem Python 3.10.0 (van Rossum i Drake, 2009) oraz R 4.3.1 (R Core Team, 2020). Uzyskane wyniki opracowano również graficznie z zastosowaniem biblioteki Matplotlib co wydatnie ułatwia weryfikację i porównania identyfikowanych zmian badanych wskaźników.

7. Przydatności uzyskanych wyników w praktyce: Podjęte przez Autorkę badania posiadaj się nie tylko walor poznawczy podstawowy ale też potencjalnie istotne znaczenie aplikacyjne w niwelowaniu niekorzystnych skutków niedobowu selenu. Co jest istotne Seleninotriglicerydy jest obecnie definiowana jako nowa forma organicznego selenu, będącego na IV stopniu utlenienia. Zarówno sposób wytworzenia tych związków w wyniku chemicznej modyfikacji oleju słonecznikowego kwasem selenowym jak ich właściwości lipofilowe ułatwiające wchłanianie i dystrybucję w organizmie oraz relatywnie niska toksyczność, czynią je atrakcyjnymi źródłami dla suplementacji selenu u zwierząt. Uzyskane wyniki pozwoliły autorce sformułować 5 ogólnych wniosków które w mojej ocenie są poprawne.

8. Uwagi polemiczne i dyskusyjne: Nie mam krytycznych uwag polemicznych dotyczących merytorycznej wartości rozprawy i prezentowanych w niej wyników. Tym niemniej doprecyzowania wymaga opis materiału. Czy zwierzęta były spokrewnione, czy też wybierane losowo. Ponadto w „Materiałach i metodach" pojawiła się nieścisłość. W opisie Autorka stwierdza, że „Do analizy stabilności ekspresji wybrano 8 genów referencyjnych przedstawionych w Tabeli 2." Podczas gdy, w tytule Tabeli 2. mamy: „Sekwencje starterów dla genów referencyjnych i badanych wykorzystanych podczas badań genetycznych u jagniąt."- i są to cztery geny – dwa referencyjne i dwa badane (8 starterów) . Podobny błąd dotyczył opisu dla badań u koźląt - „Informacje na temat sekwencji starterów zastosowanych do amplifikacji fragmentów genów referencyjnych zawarto w tabeli 3." Podczas gdy, tabela przedstawia „Sekwencje starterów dla genów referencyjnych i badanych wykorzystanych podczas badań genetycznych u koźląt".

Przedstawione uwagi nie ujmują wartości rozprawy, którą oceniam wysoko. Na uwagę zasługuje realizacja szeroko zakrojonych pracochłonnych badań co niewątpliwie świadczy o dużym zaangażowaniu Doktorantki. Na szczególne podkreślenie zasługuje kompleksowe podejście do prezentowanej w rozprawie tematyki, poparte szeroko cytowaną literaturą zarówno we wstępie jaki i w dyskusji.

9. Podsumowanie wyników Wniosek końcowy

Podsumowując, mogę stwierdzić, że rozprawa doktorska **lek. wet. Karolina Tatarczak** zasługuje na bardzo wysoką ocenę. Doktorantka wykazała się w niej dobrze ugruntowaną wiedzą w podejmowanym temacie, potwierdzając to znajomością literatury. Na wyróżnienie zasługuje wybór tematyki badań o znaczeniu nie tylko podstawowym ale i aplikacyjnym, model eksperymentalny umożliwiający osiągniecie założonych celów, zastosowanie różnorodnych technik badawczych oraz czytelne prezentację wyników dobrze udokumentowanej analizy statystycznej. Wobec powyższego uważam, że rozprawa doktorska **lek. wet. Karolina Tatarczak** spełnia wymogi stawiane przez ***Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. Nr. 65/03 poz. 595, z późniejszymi zmianami)***. Wnioskuję do Rady Naukowej w Dyscyplinie Nauki weterynaryjne Uniwersytet WM w Olsztynie o dopuszczenie **lek. wet. Karolinę Tatarczak** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Chandra Shekhar Pareek

[Prof. dr. hab. CHANDRA S. PAREEK]