

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Wojciechowskiej-Puchałki pt. „Wpływ kapłonowania kogutów na strukturę, metabolizm i wytrzymałość kości piszczelowo-stępowej”

Praca doktorska Pani mgr Joanny Wojciechowskiej-Puchałki została wykonana w Katedrze Genetyki, Hodowli i Etologii Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie pod kierunkiem Promotora Pani dr hab. Doroty Wojtysiak, prof. uczelni.

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Dyscypliny – Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie z dnia 23 marca 2022 roku.

Przy ocenie rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Wojciechowskiej-Puchałki uwzględniono zasadność podjętej tematyki, a także jakość formalną, metodologiczną i merytoryczną pracy, poddając szczegółowej ocenie problem badawczy, układ treści, cele i hipotezy badawcze, przyjętą metodykę badań, dyskusyjne ujęcie problemu badawczego. W recenzji przedstawiono również dostrzeżone uchybienia i braki.

Przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr Joanny Wojciechowskiej-Puchałki napisana jest w języku polskim, jest rozprawą liczącą 166 stron standardowego wydruku komputerowego formatu A4. Układ pracy i podział treści dysertacji jest tradycyjny i z formalnego punktu widzenia nie budzi zastrzeżeń. Praca zawiera: spis treści, wykaz skrótów i symboli użytych w pracy, wstęp, hipotezę i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, stwierdzenia i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim wykaz piśmiennictwa, spis rycin i tabel oraz aneksy. Rozprawa zawiera 304 pozycje piśmiennictwa, 17 rycin i 10 tabel. Szata graficzna jest staranna i estetyczna.

Ocena merytoryczna pracy

Oryginalność tematyki

Praca doktorska Pani mgr Joanny Wojciechowskiej-Puchałki wpisuje się w obszar nauki dotyczący biologii kości i stanowi kompleksowe opracowanie dotyczące wpływu kapłonowania (kastracji) w procesie dojrzewania tkanki kostnej u kogutów. Podjęte badania dotyczą określeniu

 1

parametrów wytrzymałościowych kości piszczelowo-stępowej kogutów, analizy szeregu parametrów histologicznych tkanki gąbczastej i zbitiej kości oraz ocenie zmian w wartościach markerów obrotu kostnego jakie zachodzą w wyniku przeprowadzenia zabiegu kapłonowania. Chociaż wpływ kapłonowania na podstawowe właściwości wytrzymałościowe kości długich było tematyką licznych badań, ciągle brak jest pełnych danych dotyczącego wpływu zabieg kastracji kogutów i niedoboru testosteronu na gospodarkę wapniowo fosforanową i zmiany poziomów markerów obrotu kostnego, a jego wpływ mikrostrukturę kości zbitiej i kości beleczkowej jest w dużej mierze tak naprawdę nieznaną. Również w samej pracy uzasadnienie podjętego zagadnienia przedstawiono w sposób przekonujący o konieczności i celowości podjętych badań.

Należy w tym miejscu również zaznaczyć, że badania *in ovo* i zarodki kurze są od lat wykorzystywane jako przydatny model do badania rozwoju twarzoczaszki czy rozwoju kończyn, brojlery kurze, jako ptaki szybko rosnące, są coraz częściej stosowane w badaniach przedklinicznych w doświadczeniach, w których badany jest rozwój układu kostnego u dzieci, a gospodarka mineralna u niosek w okresie nieśności oferuje interesujący, choć specyficzny, model rozwoju osteoporozy. Tym samym prezentowana tematyka badań podejmuje temat istotny nie tylko z punktu widzenia dobrostanu zwierząt i ekonomii produkcji zwierzęcej, gdzie jednostronna selekcja skierowana na zwiększenie ilości mięsa w tuszkach oraz tempo wzrostu spowodowała nasilenie częstości występowania chorób układu kostnego, czy też utrzymywania i wykorzystania wolnorosnących ras zachowawczych, ponieważ badania deficytu testosteronu na zaburzenia gospodarki hormonalnej na rozwój i homeostazę tkanki kostnej kogutów - mieszańców międzyrasowych, mogą mieć również znacznie przy szerszym wykorzystaniu kurcząt jako modelu zwierzęcego. Z tych właśnie powodów podjęta tematyka badawcza charakteryzuje się wysoką wartością naukową.

Uzasadnienie badań

Uzasadnienie podjętych badań przedstawiono w rozdziale *Wstęp*. Liczy on 24 strony i podzielony jest w 4 podrozdziały, które z kolei podzielone są na łącznie 11 pod-podrozdziałów. W rozdziale tym Autorka wprowadza czytelnika w tematykę badawczą, omawiając kolejno zagadnienia związane z budową i funkcją tkanki kostnej, jej metabolizmem, czynnikami hormonalnymi wpływającymi na remodeling tkanki kostnej, markerami obrotu kostnego oraz właściwościami wytrzymałościowymi tkanki kostnej. Informacje te zostały przedstawione w sposób przejrzysty i zrozumiały, co w przekonujący sposób przedstawia konieczność i celowości podjętych badań. Całość jest udokumentowana prawidłowo dobranymi pozycjami literaturowymi,



co dowodzi bardzo dobrej znajomości problematyki i stanowi wartościowe wprowadzenie w dalszą część rozprawy, której Autorka formułuje cel pracy, założenia i hipotezy badawcze.

Cel badań

Można mieć zastrzeżenia, że chociaż rozdział w którym przedstawiono cel pracy nazwano *Hipoteza i cel pracy* to on zawiera nie jedną, a dwie hipotezy badawcze, a jako cel pracy podano określenie parametrów mikrostrukturalnych, mechanicznych i składu mineralnego kości piszczelowo stępowej oraz poziomu wybranych markerów obrotu kostnego i hormonów zaangażowanych we wzrost i rozwój kości kastrowanych kogutów nie wskazując wprost, że odpowiednie doświadczenie wykonano w celu weryfikacji postawionych hipotez badawczych, niemniej jednak, na podstawie zawartego we wprowadzeniu opisu podjętego problemu badawczego, stwierdzam, że przedmiot rozprawy stanowi istotny problem naukowo-badawczy, którego dotychczasowy poziom poznania, w kontekście opisu zagadnienia przedstawionego we Wstępie, można uznać za niekompletny. Tym samym dokonany przez Autorkę wybór problemu naukowego i sposób jego rozwiązania spełnia wymogi stawiane w Ustawie o stopniach i tytule naukowym.

Należy zwrócić uwagę, że konieczność wykonania poszczególnych etapów badań i analiz przedstawionych w celu pracy została w sposób wyczerpujący i jasny uzasadniona we wstępie pracy w oparciu u literaturę z przedstawionego zakresu wiedzy.

Metodyka badań

Dla zrealizowania założeń rozprawy zaplanowano i przeprowadzono doświadczenie, którego przebieg opisano w rozdziale *Materiał i metody*. Rozdział ten liczy 15 stron i zawiera opis układu doświadczenia i metod badawczych, których dobór pozwala na pełne opracowanie zagadnień postawionych w metodach weryfikacji przyjętych hipotez i które są w odpowiedni sposób przedstawione i scharakteryzowane. Konieczność wykonania poszczególnych etapów badań i realizacja każdego z zaplanowanych etapów została obszernie opisana. Doktorantka w sposób poprawny dobrała metody badawcze, tak by w pełni zrealizować zamierzone cele badawcze, uzyskując wiarygodne i jednoznacznie wyniki. W rozdziale tym zawarto także informacje wymagane w tego typu pracach badawczych, w tym informację o zgodzie odpowiedniej komisji etycznej Materiał badawczy został opisany szczegółowo, w sposób wyczerpujący i spełniający kryteria opracowań naukowych. Wszystko to świadczy o dużej staranności w zaplanowaniu przebiegu doświadczenia, co pozwala mi pozytywnie ocenić

umiejętność doboru przez Autorkę metod badawczych, ich wykorzystanie i dokładne omówienie, oraz dobór modelu zwierzęcego i kości modelowej. Opis metodyki uzupełnia 5 rycin które ułatwiają zapisanie się z wykonywanymi badaniami.

Zakres wykorzystanych przez Doktorantkę metod oceniam bardzo wysoko. Przeprowadzenie analizy parametrów strukturalnych tkanki kostnej, poza wykonaniem testu trójpunktowego zganiania i wykonaniem standardowej oceny parametrów wytrzymałościowych kości, oceniam bardzo wysoko z punktu widzenia badania właściwości biomechanicznych tkanki kostnej. Wymagają one pewnej wiedzy z zakresu mechaniki, są tym samym bardzo rzadko wykonywane w badaniach z obszaru *animal science*, niemniej jednak, podobnie jak analizy markerów obrotu kostnego, są one niezwykle wartościowe w przypadku badań na modelach zwierzęcych. Równie wysoko oceniam wykonanie analiz histologicznych, zarówno dla kości zbitnej w obszarze trzonu jak i kości beleczkowej w obszarze nasad. Oba typy kości różnią się tempem metabolizmu i remodelingu, zatem wykonanie badań histologicznych w obu rodzajach kości pozwoliło uzyskać pełniejszy obraz zmian zachodzących w tkance kostnej w wyniku kapłonowania, przy czym należy podkreślić, że badania takie do tej pory nie były u kapłonów niewykonywane. Tak szerokie spektrum zastosowanych metod umożliwiło kompleksowe zweryfikowanie postawionych hipotez badawczych.

Opis doświadczenia skłania jednak do postawiania pytania, dlaczego badania zakończyły się po 24. tygodniu życia ptaków - w pracy brakuje tej informacji. Kapłony, jako zwierzęta przeznaczone do konsumpcji, ubija się przed osiągnięciem dojrzałości płciowej. Autorka zakłada, że koguty mieszańców osiągnęły dojrzałość płciową pomiędzy 20. a 24. tygodniem życia (s. 84). Wskazywało by to na wydłużenie eksperymentu poza standardowy okres utrzymywania tego typu kapłonów, co należy oczywiście odebrać bardzo pozytywnie z punktu widzenia postawionych w pracy tez badawczych.

Grupy badawcze sformułowano w sposób poprawny, liczebność osobników poddana analizie w każdym etapie badań, po 8 osobników w grupie, jest wystarczająca do wyciągnięcia wniosków i odpowiednia do wykonania analiz statycznych. Zastosowane metody analizy statystycznej oceniam jako prawidłowe i adekwatne do tego typu analiz, jednak z punktu widzenia recenzenta mam kilka uwag, dotyczących podejścia statystycznego – czy dla wszystkich danych, które nie miały rozkładu normalnego udało się uzyskać rozkład normalny po transformacji i czy konieczne było zatem wykonanie testów nieparametrycznych? Jeśli tak, to jaki zastosowano test porównań wielokrotnych - test Dunna? Kolejna uwaga dotyczy obserwacji, że jeśli aż w tyłu

przypadkach stwierdzono, że efekt interakcji nie był istotny statystycznie, czemu nie uproszczono modelu i nie wykonano analiz tylko dla efektów głównych?

Wyniki przeprowadzonych badań

Rozdział *Wyniki* liczy 30 stron został opracowany bardzo starannie. Podkreślić należy obszerny materiał dokumentujący otrzymane wyniki składający się z 7 tabel i 7 poglądowych rycin, co ułatwia zapoznanie się z otrzymanymi rezultatami. W rozdziale tym Autorka w sposób bardzo szczegółowy przedstawiła otrzymane wyniki, starając się w spójny i klarowny sposób przedstawić wyniki badań wraz z ich interpretacją statystyczną. Prezentowane wyniki stanowią cenne źródło wiedzy na temat zmian mineralizacji, parterów wytrzymałościowych i struktury tkanki kostnej oraz markerów obrotu kostnego u kogutów i kapłonów w wieku 16-24 tygodni.

Dyskusja i omówienie otrzymanych rezultatów

Dyskusję otrzymanych wyników przedstawiono w kolejnym rozdziale, gdzie na 23 stronach zawarto niezwykle wyczerpujące omówienie otrzymanych wyników w odniesieniu do innych danych opisanych w literaturze. Na podkreślenie zasługuje umiejętność Autorki poprowadzenia wyводу ujętego w sposób problematyczny i rzeczową interpretację otrzymanych wyników, chociaż przy tak szerokim materiale wynikowym można było rozważyć podzielenie dyskusji na podrozdziały odpowiadające poszczególnym zagadnieniom.

Ponieważ dużą część otrzymanych wyników uzyskanych zostało dla kapłonów po raz pierwszy za bardzo interesujące i wartościowe uważam przeprowadzenie dyskusji nie tylko z innymi opracowaniami otrzymanymi dla kapłonów, ale również z badaniami badań wykonanymi na innych modelach zwierzęcych, głównie orchidektomizowanych szczurów. W mojej opinii takie porównanie może w przyszłości pozwolić na wspomniane wcześniej szersze użycie kogutów szybko- i wolnorosących oraz mieszańców w badaniach modelowych.

Dokonując analizy zebranej literatury oraz wyników badań własnych Autorka sformułowała 6 wniosków końcowych. Szkoda, że chociaż znajdują dobre uzasadnienie w przeprowadzonych badaniach i otrzymanych wynikach, nie zostały one sformułowane w sposób bardziej zwięzły. Pewien niedosyt stanowi również brak sformułowanego końcowego wniosku praktycznego oraz wskazania kolejnych kierunków badań w tym zakresie.

Spis piśmiennictwa jest zawarty na 28 stronach. Analiza literaturowa zawarta w pracy została oparta na 304 pozycjach piśmiennictwa pochodzącego w większości z czasopism o zasięgu międzynarodowym (tylko 39 pozycji polskojęzycznych), przy czym należy

podkreślić walor aktualności dużej części przywoływanych pozycji (dwie pozycje z lat 60. XX wieku, najstarsza z 1964, oraz 10 pozycji z lat 80.). Całość umiejętnie wkomponowano w tekst rozprawy, zarówno we wstępie, jak i w dyskusji otrzymanych wyników. Tak bogaty dobór literatury wskazuje na solidne przygotowanie Autorki do analizy podjętego problemu badawczego i świadczy o dużym wkładzie pracy w rzetelne przedstawienie omawianych zagadnień.

Uwagi krytyczne

Chociaż praca napisana jest poprawnym językiem świadczącym o dobrym zrozumieniu zakresu poruszanych problemów, Autorka nie ustrzegła się licznych błędów interpunkcyjnych (przecinki), gramatycznych (stawianie kropki po wieku ptaków, co tworzy liczebnik porządkowy), oraz, mniej licznych, błędów stylistycznych. Z obowiązku recenzenta pragnę też zwrócić uwagę Autorce na pewnie inne wybrane niedociągnięcia w pracy. W wykazie skrótów sugerowałbym poprawki: moment bezwładności to *moment of inertia*; NF- κ B to jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B, NFATc1 należałoby przetłumaczyć jako jądrowy czynnik cytoplazmy aktywnych limfocytów T1 (*nuclear factor-activated T cells cytoplasmic 1*); P1NP to N-końcowy propeptyd prokolagenu typu 1; pQCT – obwodowa ilościowa tomografia komputerowa; RANKL – receptorowy aktywator czynnika jądrowego κ B; TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta; TNFR – receptor dla martwicy nowotworów; VIP – wazoaktywny (poli)peptyd jelitowy. W pracy brakuje informacji o źródle zdjęć przedstawionych na rycinie 2 (s. 15). W warunkach fizjologicznych kość poddawana jest też ścinaniu, np. w obszarze szyjki kości udowej (s. 31). Poprawna nazwa testu to „test zginania trójpunktowego”, mamy wtedy też do czynienia z *ugięciem*, a nie *wygięciem* kości (s. 31, s. 41). Kość beleczkowa również sprawuje funkcję mechaniczną, o czym świadczy np. ułożenie beleczek w nasadzie kości udowej (s. 33). Przy opisie wytrzymałości kości zbitej, należałoby poprawić zdanie stwierdzenie, że chociaż linie cementowe zmniejszają wytrzymałość kości zbitej, to ograniczając zakres propagacji mikropęknięć redukują ryzyko złamań kości (s. 33). Poprawna nazwa Instytutu Zootechniki w Balicach to Instytut Zootechniki PIB w Balicach (s. 35). W przypadku przygotowywania rozprawy do druku w formie publikacji należałoby uzupełnić metodykę analizy składników pasz o odpowiednie numery AOAC (s. 35). Brakuje informacji z której strony ciała pochodziły kości na których wykonano analizy densytometryczne, geometryczne i wytrzymałościowe. Jednostką momentu gnącego jest [N·mm] a nie [N/mm] (s. 44, s. 65). W podpisie ryc. 16 i 17 należałoby wskazać jaka barwa oznacza kolagen cienko-, a jaka grubowłóknisty. Rola hormonu wzrostu w dojrzewających płciowo kogutów jest faktycznie nie tak dobrze poznana jak u niosek, jednak istnieją już prace poruszające

to zagadnienie, np. zespołu Luna i in, np. *Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken (2004): heterogeneity and changes during ontogeny and maturation*, czy praca przeglądowa *Extrapituitary growth hormone in the chicken reproductive system (2014)*.

W tym miejscu wskażę również na potrzebę weryfikacji protokołu barwienia safraniną O przedstawionego w Aneksie 1 – czy punkt 3-7 wskazują na modyfikację standardowego barwienia safraniną czy jest to błąd edytorski?

Przedstawiane uwagi krytyczne mają charakter głównie redakcyjny w żaden sposób nie wpływają na jej jednoznacznie pozytywną ocenę merytorycznej strony rozprawy, jednocześnie pomogą prawidłowo przygotować pracę do opublikowania.

Wniosek końcowy

Podsumowując, wyniki otrzymane w ramach przeprowadzonych badań stanowią spójne i kompleksowe opracowanie podjętego problemu badawczego. Wnioski wyścignięto poprawnie, i stanowią one podstawę do dalszych badań w tym zakresie. Niniejszą pracę oceniam bardzo wysoko, zarówno od strony merytorycznej jak i formy prezentacji.

W mojej opinii rozprawa Pani mgr Joanny Wojciechowskiej-Puchałki stanowi bardzo wartościowe opracowanie naukowe dotyczące aktualnego problemu badawczego. Przedstawiona praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i tym samym rozprawa doktorska w pełni odpowiada warunkom określonym w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U. z 2014 r., poz. 1852 ze zm. W dz. U. z 2015 r. poz. 249). Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Joanny Wojciechowskiej-Puchałki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z pełnym przekonaniem uważam, że jakość przeprowadzanych badań i bardzo szczegółowe opracowanie wyników oraz dojrzała dyskusja upoważniają mnie do wnioskowania, by uznać rozprawę za wyróżniającą. W związku z powyższym, wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą zgodnie z kompetencjami Wysokiej Rady.



dr hab. Siemowit Muszyński, prof. uczelni