

dr hab. Dorota Wojtysiak, prof. URK

Kraków, 16.06.2022 r.

Katedra Genetyki, Hodowli i Etologii Zwierząt

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. wet. Sebastiana Słodkiego pt. „Wpływ procesu starzenia na mikrostrukturę wybranych mięśni szkieletowych psów”

Praca doktorska Pana lek. wet. Sebastiana Słodkiego została wykonana na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Zoofizjoterapii Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy, pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Joanny Boguckiej prof. PBS.

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Dyscypliny – Zootechnika i Rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy z dnia 22 kwietnia 2022 roku.

Przy ocenie rozprawy doktorskiej Pana lek. wet. Sebastiana Słodkiego 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 oraz dyskusyjne ujęcie problemu badawczego. W recenzji przedstawiono również dostrzeżone uchybienia i braki.

Przedstawiona do oceny dysertacja Pana lek. wet. Sebastiana Słodkiego napisana jest w języku polskim, jest rozprawą liczącą 116 stron. Układ pracy i podział treści dysertacji jest tradycyjny i z formalnego punktu widzenia nie budzi zastrzeżeń. Praca zawiera: Wykaz stosowanych skrótów, Spis treści, Wstęp, Hipotezę badawczą i cele pracy, Przegląd piśmiennictwa, Materiał i metody, Wyniki i dyskusję, Podsumowanie i wnioski, Literaturę oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim. Rozprawa zawiera 248 pozycji piśmiennictwa, 14 fotografii, 19 tabel oraz 4 wykresy. Szata graficzna jest staranna i estetyczna.

Ocena merytoryczna pracy

Oryginalność tematyki

Praca doktorska Pana lek. wet. Sebastiana Słodkiego wpisuje się w obszar nauki dotyczący biologii mięśni i stanowi kompleksowe opracowanie dotyczące wpływu procesu starzenia się organizmu na mikrostrukturę mięśni psów. Podjęte badania dotyczą określenia parametrów mikrostrukturalnych mięśni, w tym kompozycji włókien mięśniowych, mikrounacznienia, udziału tłuszczu śródmięśniowego, a także określenia szeregu zmian histopatologicznych w strukturze mięśni, jak również ocenę zdolności do regeneracji włókien mięśniowych na podstawie określenia liczby komórek satelitarnych oraz zmian w parametrach morfologicznych i biochemicznych krwi psów w różnych grupach wiekowych. Choć proces starzenia się mięśni to bardzo aktualny i szeroko omawiany temat w medycynie ludzkiej, to w przypadku zwierząt towarzyszących, w tym kotów i psów, jest w dużej mierze tak naprawdę nieznaną. Stąd też podjęte przez Doktoranta badania uważam za aktualne i uzasadnione, tak z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia. Wyniki przeprowadzonych przez Doktoranta badań pozwalają prześledzić nie tylko zmiany zachodzące w mikrostrukturze mięśni u psów w trakcie starzenia się organizmu, ale co warte podkreślenia, szczególnie ze względu na ich pionierski charakter, mogą stać się cennym materiałem wyjściowym do wypracowania skutecznych metod opóźniających zmiany degradacyjne zachodzące w mięśniach szkieletowych starzejących się psów, a to może znaleźć zastosowanie w fizjoterapii starzejących się zwierząt.

Uzasadnienie badań

Uzasadnienie podjętych badań przedstawiono w rozdziałach *Wstęp* oraz *Przeгляд piśmiennictwa*. Liczą one 29 stron, z czego *Przeгляд piśmiennictwa* podzielony jest na 9 podrozdziałów. W rozdziale tym Autor wprowadza czytelnika w tematykę badawczą, omawiając zagadnienia związane z mikrostrukturą mięśni, a także szczegółowo czynnikami zaburzającymi homeostazę mięśni w procesie starzenia. 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 piśmiennictwa, co dowodzi bardzo dobrej znajomości problematyki i stanowi wartościowe wprowadzenie do podjętej w pracy tematyki badawczej, a różnorodność i obszerność opisywanych zagadnień z pewnością ułatwia zrozumienie wyników przeprowadzonych badań. Do tej części pracy mam tylko kilka drobnych uwag:

- na stronie 29 – ostatni akapit Autor wspomina, że cyt. „*Mięśnie szkieletowe składają się morfologicznie i funkcjonalnie z tkanki mięśniowej oraz zawierają tkankę nerwową, łączną i naczyniową*” – pragnę w tym miejscu zauważyć, że w histologii nie ma ‘tkanki naczyniowej’ i doprecyzować, że tkanką mięśniową budującą mięśnie szkieletowe jest tkanka mięśniowa poprzecznie prążkowana szkieletowa.

- Druga uwaga dotyczy opisanego przez Doktoranta zrębu łącznotkankowego mięśni (strona 30, pierwszy akapit). Autor podaje, że cyt. „...*endomysium dzieli mięsień na wiązki pierwotne, wtórne i trzeciorzędowe*”, gdy tymczasem *endomysium* to delikatna sieć tkanki łącznej, która otacza pojedyncze włókna mięśniowe oddzielając je od siebie. W *endomysium* przebiegają naczynia kapilarne i nerwy, a jego funkcja polega przede wszystkim na zabezpieczeniu włókien mięśniowych poprzecznie prążkowanych szkieletowych przed odkształceniem w trakcie skurczu i rozkurczu,

i ostatnie uwaga to użycie określenia ‘mięsień najdłuższy grzbietu – *m. longissimus dorsi*’ – zgodnie z nomenklaturą anatomiczną (Millart Z. *Anatomiczne mianownictwo weterynaryjne PZWiL*, 2002) mięsień ten to mięsień najdłuższy, czyli *m. longissimus*, w którym można wyróżnić pięć segmentów, a mianowicie: *m. longissimus lumborum*, *m. longissimus thoracis*, *m. longissimus cervicis*, *m. longissimus atlantis* oraz *m. longissimus capitis*.

Są to oczywiście uwagi marginalne, które w żadnym stopniu nie umniejszają wartości merytorycznej doskonale opracowanej tej części dysertacji.

Cel badań

W kolejnym rozdziale Doktorant przedstawił hipotezę i cel badań. Hipoteza badawcza pracy sformułowana jest rzeczowo i przedstawia w zwięzłej formie założenia, które Doktorant zamierza zweryfikować na podstawie przeprowadzonych analiz i testów laboratoryjnych. Biorąc pod uwagę fakt, że do cech biologicznego starzenia się organizmu należą m.in. zmiany w anatomicznych i czynnościowych właściwościach mięśni szkieletowych, takie jak: zmniejszenie masy i siły skurczu mięśni, zanikające unerwienie mięśni, zmiany kurczliwości włókien mięśniowych oraz liczne zmiany na poziomie komórkowym i enzymatycznym Doktorant postawił sobie ambitny cel oceny wpływu procesów starzenia na cechy mikrostruktury mięśnia dwugłowego ramienia (*m. biceps brachii*) i czworogłowego uda (*m. quadriceps femoris*) psów. Na podkreślenie zasługuje bardzo szeroki i kompleksowy zakres zaplanowanych analiz i eksperymentów.

Metodyka badań

Dla zrealizowania założeń rozprawy zaplanowano i przeprowadzono doświadczenie, którego przebieg opisano w rozdziale *Materiał i metody*. Rozdział ten liczy 9 stron i zawiera opis układu doświadczenia i metod badawczych. Do osiągnięcia zamierzonego celu Doktorant przeanalizował fragmenty mięśni pobrane od 33 psów w przedziale wiekowym od 8 tygodni do 18 lat. Psy podzielono na 4 grupy wiekowe, a mianowicie grupę I stanowiły psy od urodzenia do 1 roku życia (4 osobniki), grupę II – psy od 1 do 5 roku życia (4 osobniki), grupę III – psy od 5 do 10 roku życia oraz grupę IV – psy powyżej 10 roku życia (15 osobników). Analizowano kompozycję włókien mięśniowych, w tym wielkość i udział procentowy poszczególnych typów włókien mięśniowych, zawartość tłuszczu śródmięśniowego, a także przeprowadzono ocenę histopatologiczną mięśni obejmującą takie zmiany jak: atrofia włókien, włókna olbrzymie, zmiana kształtu włókien, martwica włókien z fagocytozą, rozszczepienie włókien oraz subiektywną ocenę przerostu tkanki łącznej. Z kolei, metodą immunohistochemiczną wyznaczono kapilary oraz komórki satelitarne w analizowanych mięśniach. Dodatkowo, w celu precyzyjnego określenia stanu zdrowotnego analizowanych zwierząt i jego wpływu na wyniki badanych mięśni, oznaczono wskaźniki morfologiczne i biochemiczne krwi, a także metodą RIA poziom tyroksyny. Opis metodyki uzupełnia jedna tabela i 2 ryciny, które ułatwiają zapoznanie się z wykonywanymi badaniami.

Rozdział ten zredagowano dużą dbałością o poprawność językową oraz szczegóły przeprowadzonych eksperymentów. W sposób wręcz wzorcowy przedstawiono metodologię przeprowadzonych analiz, a uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy zastosowaniu adekwatnych testów. W rozdziale tym zawarto także informacje wymagane w tego typu pracach badawczych, w tym informację o zgodzie opiekunów psów na pośmiertne pobranie wycinków mięśni do badań. Wszystko to świadczy o dużej staranności w zaplanowaniu przebiegu doświadczenia, co pozwala mi pozytywnie ocenić umiejętność doboru przez Autora metod badawczych, ich wykorzystanie i omówienie.

To czego zabrakło mi w tym rozdziale dysertacji to przede wszystkim dane dotyczące masy ciała zwierząt, która jest jednym z ważniejszych czynników warunkujących wielkość włókien mięśniowych, a także masę badanych mięśni i ich udział procentowy w masie ciała zwierząt. Rozumiem jednak, że z przyczyn niezależnych od Autora analiza opierała się tylko na fragmentach analizowanych mięśni. Uzupełnienia wymaga także opis analizy immunohistochemicznej, gdzie nie podano rozcieńczenia przeciwciała przeciw CD31, a także analiza statystyczna wyników. Autor podaje, że cyt. „...w celu zbadania istotności różnic dla badanych cech i ich grup ...

wykonano wieloczynnikową analizę wariancji”. Warto w takim miejscu podać dokładnie jakie efekty główne były analizowane i czy stwierdzono pomiędzy nimi interakcje. Czy w analizie statystycznej uwzględniono płeć zwierząt i ewentualnie masę ciała? Ponadto, pięć pozycji literatury cytowane w tym rozdziale (Łomnicki 2010; McDonald 2009; Stanisław 2006, 2007 oraz Stanisław i Sarnecki 2000) nie zostały uwzględnione w spisie literatury.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej części dysertacji. Praca została starannie zaplanowana i wykonana z zastosowaniem odpowiednich technik badawczych, które wzajemnie się uzupełniają, co potwierdza posiadanie przez Doktoranta umiejętności planowania badań i odpowiedniego całościowego ujęcia ich wyników, a to zasługuje na duże uznanie.

Wyniki i Dyskusja

Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione i udokumentowane bardzo rzetelnie w formie 17 tabel, 14 fotografii i 4 wykresów oraz przedyskutowane na 42. stronach maszynopisu w rozdziale *Wyniki i Dyskusja*. Zawarte tu dane są w pełni zgodne z założoną hipotezą badawczą, materiałem i metodami przyjętymi w niniejszej dysertacji doktorskiej. Przedstawione wyniki są ciekawe i jednocześnie inspirują do dalszych badań. Mają także swoją wartość poznawczą i wartość praktyczną. Na pochwałę zasługuje forma prezentowania wyników. Tabele i fotografie są przejrzyste i czytelne, zredagowane z dużą starannością. Jedyna moja uwaga w tym zakresie dotyczy samego zapisu danych liczbowych w tabelach, a mianowicie „średnia \pm SD”. Średnia arytmetyczna jest miarą położenia, odchylenie standardowe natomiast jest miarą zmienności. Mierzą one zupełnie inne cechy próby i nie należy ich łączyć znakiem „ \pm ”.

Dyskusja jest merytoryczna, konkretna, logicznie przeprowadzona i dobrze udokumentowana cytowanymi źródłami. Na podkreślenie zasługuje umiejętność Autora poprowadzenia wyводу ujętego w sposób problematyczny i rzeczową interpretację otrzymanych wyników.

Mam jednak kilka uwag do interpretacji danych:

- str. 55 Autor podaje, że cyt. „Najmniejszą gęstością kapilar natomiast charakteryzowały się mięśnie grupy psów w wieku do 1 roku oraz geriatrycznych”, - jest to nieprecyzyjne określenie, ponieważ zgodnie z tabelą 5, zarówno w przypadku mięśnia *biceps brachii* jak i *quadriceps femoris*, nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic w liczbie kapilar pomiędzy grupą psów do 1 roku życia (I) i grupą III tj. psów w przedziale wiekowym 5-10 lat.

- str. 55 cyt. „Największa liczba kapilar w grupie 2. i 3. wynika ze wzrostu i zwiększonej aktywności fizycznej” – jeśli różnice nie są istotne statystycznie to nie można używać określenia ‘największa’, a zgodnie z tabelą 5 liczba kapilar w grupie 3. nie różniła się istotnie statystycznie również z grupą 1,

- str. 59 cyt. „Badając wpływ wieku psów na rozległość zmian patologicznych, a co się z tym wiąże – liczbę prawidłowych włókien mięśniowych BB i QF, stwierdzono, że największą liczbą prawidłowo zbudowanych komórek mięśniowych charakteryzowały się mięśnie psów najmłodszych i różniły się one statystycznie z pozostałymi grupami ($P \leq 0,01$). Na tej podstawie można zauważyć, iż wraz z wiekiem maleje liczba włókien mięśniowych...” Zgodnie z metodyką przedstawioną przez Doktoranta - str. 48 - analiza histopatologiczna mięśni obejmowała oznaczenie ilościowe zmian na powierzchni $1,5 \text{ mm}^2$. Tym samym logiczne jest, że przy wzroście średnicy włókien mięśniowych u starszych zwierząt, co przedstawił Autor w tabeli 3, liczba włókien na założonym obszarze ($1,5 \text{ mm}^2$) będzie mniejsza u starszych zwierząt w porównaniu z młodszymi, co wcale nie świadczy o spadku liczby włókien mięśniowych w całym mięśniu wraz z wiekiem psów. Lepszym sposobem przedstawienia tego typu danych jest przedstawienie ich w formie udziału procentowego w stosunku do ogólnej liczby włókien, co Autor przedstawił na wykresach 1-2. Jednak brak zaznaczonych istotności różnic uniemożliwia właściwą interpretację uzyskanych wyników,

- i jeszcze jedno uzupełnienie - na stronie 62 Doktorant podaje, że cyt. „Zanik (atrofia) oznacza stopniowe pomniejszanie objętości komórek, co prowadzi do zmniejszenia się narządu i upośledzenia jego czynności.” Jest to oczywiście prawda jednak nie w każdym przypadku. Warto pamiętać, że zanik nie musi wiązać się ze zmniejszeniem narządu czego przykładem może być osteoporotyczna kość, gdzie dochodzi do zaniku beleczek kostnych a z drugiej strony, makroskopowo, kość zachowuje te same wymiary. Z kolei, w przypadku rozedmy płuc, której przejawem jest zanik elementów sprężystych zrębu płuc, a nawet części przegród pęcherzykowych, co prowadzi do zmniejszenia powierzchni oddechowej płuc, płuca rozedmowe są większe, bardziej rozciągnięte w porównaniu do prawidłowo funkcjonujących płuc.

W kolejnym rozdziale, dokonując analizy zebranej literatury oraz wyników badań własnych, Autor sformułował 7 wniosków końcowych. Ich treść jest uzasadniona wynikami badań i w pełni odpowiada na postawione w celu dysertacji pytania.

Spis piśmiennictwa jest zawarty na 15 stronach. Analiza literaturowa zawarta w pracy została oparta na 248 pozycjach piśmiennictwa pochodzącego w większości

z czasopism o zasięgu międzynarodowym (tylko 15 pozycji polskojęzycznych), przy czym należy podkreślić walor aktualności dużej części przywoływanych pozycji. Całość umiejętnie wkomponowano w tekst rozprawy, zarówno w *Przeglądzie piśmiennictwa*, jak i w *Wynikach i Dyskusji*. Tak bogaty dobór literatury wskazuje na solidne przygotowanie Autora do analizy podjętego problemu badawczego i świadczy o dużym wkładzie pracy w rzetelne przedstawienie omawianych zagadnień.

Praca zakończona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim, które w dobry sposób oddaje cel pracy, najważniejsze fakty metodologiczne i co najważniejsze osiągnięte przez Doktoranta efekty badań.

Inne drobne uwagi edytorskie to:


- należy ujednoczyć nazewnictwo analizowanych mięśni i konsekwentnie w całej pracy stosować albo nazwy polskie, albo łacińskie, albo też skróty,
- w rozdziale 'Wykaz skrótów' brakuje objaśnienia stosowanych przez Doktoranta skrótów nazw analizowanych mięśni oraz parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi,
- str. 86 należy ujednoczyć zapis skrótów zastosowanych do określenia fosfatazy zasadowej (AP czy ALP),
- tabela 12 str. 74 – w jednym miejscu tabeli błędnie podano współczynnik korelacji pomiędzy rozszczepieniem włókien a atrofią – jest '<0,001', a powinno być '0,36**'
- dwie pierwsze pozycje literatury mają ten sam numer porządkowy.

Przedstawiane w niniejszej recenzji uwagi i spostrzeżenia mają charakter pomocniczy, głównie redakcyjny i w żaden sposób nie wpływają na jednoznacznie pozytywną ocenę merytorycznej strony dysertacji. Moim zdaniem wyniki otrzymane w ramach przeprowadzonych badań stanowią spójne i kompleksowe opracowanie podjętego problemu badawczego. Wnioski wyciągnięto poprawnie, i stanowią one podstawę do dalszych badań w tym zakresie. Niniejszą pracę oceniam bardzo wysoko, zarówno od strony merytorycznej jak i formy prezentacji.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny dysertacja Pana lek. wet. Sebastiana Słodkiego stanowi bardzo wartościowe i oryginalne opracowanie problemu naukowego i tym samym w pełni odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z

późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) oraz Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym przedkładam Radzie Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy wniosek o dopuszczenie Pana lek. wet. Sebastiana Słodkiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Dorota Wojtysiak, prof. URK