

## Ocena

### Rozprawy doktorskiej mgr Barbary Mních

#### pt. „Gęstość kości a strategie odżywiania subfossylnych populacji ludzkich z terenu południowej Polski w świetle analiz molekularnych i izotopowych”

Rozprawa doktorska mgr Barbary Mních poświęcona jest kompleksowej analizie czynników wpływających na gęstość kości w populacji z południowej Polski, z wykorzystaniem najnowszych technik molekularnych i izotopowych. Głównym celem pracy było określenie zależności pomiędzy spożywaniem mleka i/lub produktów wysokowapniowych a gęstością mineralną kości. Materiał badawczy stanowiły fragmenty kostne pochodzące ze stanowisk archeologicznych w Sanoku, datowane na XIV-XVII wiek oraz z Wawrzeńczyc, datowane na XI-XIII wiek. W swojej pracy Autorka zastosowała interdyscyplinarne metody badawcze, obejmujące analizę trwałych izotopów wapnia oraz analizę polimorfizmu genu warunkującego nietolerancję laktozy. Takie wielowymiarowe podejście metodologiczne czyni pracę wyjątkowo oryginalną i wartościową.

Przedstawiona do oceny praca ma charakter monografii składającej się z czterech obszernych rozdziałów, zakończonej podsumowaniem i wnioskami. Praca, ze względu na swoją złożoność oraz obszerność zastosowanych metod, odbiega nieznacznie od charakterystycznego układu eksperymentalnych rozpraw doktorskich. Biorąc pod uwagę liczbę metod zastosowanych w pracy, odejście od klasycznego układu i poświęcenie osobnych rozdziałów na omówienie wyników uzyskanych w każdej odrębnej analizie jest uzasadnione i czyni pracę uporządkowaną i przejrzystą.

W pierwszym rozdziale, zatytułowanym „Izotopy wapnia”, Doktorantka wprowadza czytelnika w zagadnienia oddziaływania procesów diagenetycznych na proporcje izotopowe wapnia, frakcjonowanie izotopowe i efekt poziomu troficznego, dostępności i przyswajania wapnia, ze szczególnym uwzględnieniem gospodarki mineralnej wapnia w ciąży i podczas laktacji oraz zastosowania badań izotopowych wapnia do rekonstrukcji diety przeszłych pokoleń. Po opisie metody spektroskopii masowej w zastosowaniu do oznaczenia izotopów wapnia, Autorka omawia uzyskane wyniki, a następnie poddaje je dyskusji. Istotą tego

rozdziału było oszacowanie poziomu spożycia mleka oraz produktów wysokowapniowych jako komponent diety badanych populacji, na podstawie proporcji izotopowej wapnia. Cel ten wydaje się dość ryzykowny i dyskusyjny w świetle przeglądu piśmiennictwa jakiego dokonała Autorka w tym rozdziale. Wynika z niego, że „ukształtowały się dwa przeciwstawne stanowiska, nie dające jednoznacznej odpowiedzi na temat użyteczności analiz izotopowych wapnia w ocenie udziału w diecie produktów mlecznych” (str. 27, 2 akapit). Jednakże w kontekście całej pracy, takie podejście metodologiczne Doktorantki należy uznać za pewną śmiałość i odwagę naukową, cechującą ambitnych, młodych naukowców, podejmujących poważne wyzwania. Jak można było się przekonać w dalszej części dyskusji, Autorka bardzo ostrożnie interpretuje uzyskane wyniki i przedstawia je na tle innych wyników zaczerpniętych z licznie zebranej literatury. Wykazano istotne różnice pomiędzy badanymi populacjami, a także istotne różnice płciowe w populacji z Sanoka. Doktorantka słusznie wnioskuje, że dieta bogata w mleko i jego przetwory może być czynnikiem różnicującym.

Moje drobne uwagi dotyczące tego rozdziału odnoszą się do przedstawienia wyników na rycinie 6 i 7. Otóż brak jest stosownego opisu tego, co owe ryciny przedstawiają, średnie, mediany,  $\pm$  błąd standardowy, przedział ufności ( $\pm 1,96 \times$  błąd standardowy), czy też zakres 25% - 75%.

W rozdziale II mgr Barbara Mních dokonuje opisu analizy częstości polimorfizmu genu LCT-1310 w badanych populacjach na tle obszernego wstępu teoretycznego, przybliżającego zagadnienia genetycznego uwarunkowania tolerancji laktozy, rozpowszechnienia nietolerancji laktozy w świecie, jej niedoboru w populacjach pradziejowych oraz metody identyfikacji polimorfizmu badanego genu. Podobnie jak w rozdziale poprzednim, wstęp stanowi doskonały przykład erudycji i obeznania w piśmiennictwie tematycznym. Uzyskane wyniki wskazywały na ponad 60% udział homozygot CC warunkujący nietolerancję laktozy w przybliżeniu w obu populacjach. Wynik ten, w połączeniu z poziomem izotopów wapnia, ma duże znaczenie przy rekonstrukcji nawyków żywieniowych badanych populacji.

Obszerny opis stosowanych metod oraz czynników warunkujących gęstość mineralną kości, jak i przedstawienie wyników badania DXA oraz QUS, stanowi treść trzeciego rozdziału niniejsze rozprawy. Kompletność opisu metod i pokrewnych zagadnień wskazuje na profesjonalne podejście mgr Mních. Mam jednak kilka zasadniczych uwag do tego etapu badań Doktorantki.

Standardowo w metodzie DXA pomiaru gęstości kości dokonuje się w miejscu największego skupiska tkanki kostnej gąbczastej, tj. w odcinku lędźwiowym lub na kości udowej w tzw. trójkącie Warda. Wiadomo też, że kręgi są tymi fragmentami szkieletu, które zwykle dość dobrze zachowują się na stanowiskach archeologicznych. Doktorantka wybrała kość promieniową przedramienia. Czy ten wybór wynika tylko z dostępności dobrze zachowanego materiału, czy też inne względy miały decydujące znaczenie?

Metoda absorpcjometrii podwójnego promieniowania rentgenowskiego stanowi obecnie tzw. złoty standard w badaniach nad gęstością mineralną kości. Dysponując tą metodą, Autorka zdecydowała się poszerzyć swoje badania o dodatkową metodę ultradźwiękową. Biorąc pod uwagę bardzo rozbudowany zakres metodologiczny niniejszej pracy, w mojej ocenie ta decyzja była dość ryzykowna i nie jestem przekonany czy właściwa. Po pierwsze, uzyskane wyniki są dla obu metod nie do końca spójne i jednoznaczne. Stanowi to pewną trudność interpretacyjną i wpływa na ostateczne wnioski pracy. Po drugie, zastosowana metoda oceny zgodności dwóch metod jest niewłaściwa z perspektywy poprawności statystycznej. Zbieżność wyników uzyskanych dwoma metodami Autorka oceniła współczynnikiem korelacji liniowej Pearsona oraz współczynnikiem determinacji. Obliczone współczynniki wahają się w granicach od 0,29 do 0,45 w zależności od miejsca pomiaru i populacji, a wspólna wariancja maksymalnie wynosi 20%. Do porównania dwóch metod użycie współczynnika korelacji, jako miary siły związku, jest niewłaściwe. Metodę najmniejszych kwadratów, używana w klasycznej regresji i korelacji zakłada, że obie porównywane metody są wolne od błędów lub błędy mają rozkład normalny. Te założenia są zwykle niespełniane i w związku z tym stosuje się specjalne rodzaje regresji: regresję Demminga dla metod parametrycznych lub regresję Passing-Bablok jako wariant nieparametryczny. Natomiast do graficznej prezentacji zgodności metod stosuje się wykresy Bland-Altman, gdzie na osi  $x$  wykreśla się średnią dla dwóch metod, a na osi  $y$  różnice pomiędzy dwoma metodami dla danego osobnika.

Na podstawie przedstawionych przez Doktorantkę wyników, wobec mojej powyższej uwagi, trudno jest ocenić zgodność obu stosowanych metod. Nieco informacji na ten temat dostarcza tabela 10 zamieszczona na stronie 80. Wynika z niej, że zgodność obu metod co do określenia 3 kategorii osteoporozy nie osiąga, w obu miejscach pomiaru, 60% zgodności. W związku z tym należy uznać obie metody za niekompatybilne, na korzyść metody DXA. Autorka, bardzo słusznie, zrezygnowała w dalszej części rozprawy z wykorzystywania wyników uzyskanych metodą QUS.

Niezwykle cennym uzupełnieniem i niewątpliwym ułatwieniem interpretacyjnym było zamieszczenie tabeli z wartościami wskaźnika masywności dla kości ramieniowej i promieniowej dla obu populacji. Jednak pewnym niedociągnięciem ze strony Autorki był brak uzupełnienia owej tabeli o stosowne statystyki ukazujące istotność różnic pomiędzy płciami i poszczególnymi populacjami (Tabela 15, str. 97). Brak stosownych testów czyni dyskusję zawartą w paragrafie pierwszym na stronie 98 bezpodstawną.

Kolejna moja drobna uwaga edytorska dotyczy przedstawiania w tekście poziomu istotności  $p$ . Otóż przedstawienie tej wartości w postaci „ $p=0,00$ ”, jak na stronie 82, wiersz 5, z punktu widzenia matematyki pozbawione jest sensu. Wartość  $p$  powinna być podana dokładnie lub oznaczony jej poziom, np. „ $p<0,05$ ” lub „ $p<0.001$ ”.

Za niezwykle cenne uważam przedstawienie wyników gęstości mineralnej kości w grupach wiekowych na tle populacji współczesnych i innych odpowiadających skali czasowej oraz kontekstowi historycznemu (Rycina 29-32, str. 93-94). Ten element znacznie ułatwił interpretację wyników.

Rozdział IV wydaje się być kluczowym dla realizacji postawionego celu głównego rozprawy doktorskiej, ponieważ podsumowuje i zespala wszystkie uzyskane wyniki. Nie zaobserwowano związku pomiędzy gęstością mineralną kości a polimorfizmem genu warunkującego nietolerancję laktozy oraz poziomem spożycia mleka i produktów mlecznych w diecie w dwóch populacjach historycznych z terenów południowej Polski. Wydaje się, że zwiększone zróżnicowanie gęstości mineralnej kości wśród osobników z Sanoka z allelem nietolerancji laktozy jest bardzo interesującym wynikiem, otwierającym możliwości interpretacyjne. Można przypuszczać, co słusznie zauważyła Autorka, że osobnicy ci stosowali różne strategie żywieniowe w celu pozyskania stosownej ilości wapnia. Prawdopodobnie część z osób unikała produktów wywołujących dyskomfort, a inni uzupełniali dietę o produkty bogate w wapń, ale nie mające pochodzenia mlecznego.


Mam kilka drobnych uwag edytorskich do niniejszego rozdziału. Brak jest stosownego opisu tego, co właściwie przedstawiają ryciny 33-38. Natomiast ryciny 40-42 powinny być uzupełnione o stosowne testy chi-kwadrat, szacujące istotność różnic rozkładów częstości w poszczególnych grupach osób z i bez tolerancji laktozy w poszczególnych populacjach. Taki test powinien uwzględniać poprawkę Yetsa ze względu na niską liczebność w niektórych grupach.

Końcowe wnioski rozprawy zostały sformułowane poprawnie i trafnie, a Doktorantka potrafiła zaprezentować krytyczne podejście do uzyskanych wyników. Cała praca napisana jest przejrzysto, jasno i w sposób uporządkowany, przez co czyta się ją bardzo dobrze. W moim odczuciu praca stanowi cenną pozycję pod względem poznawczym, w szczególności metodologicznym i stanowi istotny wkład w rozwój wiedzy z danej dziedziny nauk biologicznych. Całość rozprawy udowodniła, że mgr Barbara Mních charakteryzuje się dojrzałością naukową oraz wnikliwością badawczą. Wysoka merytoryczna wartość pracy wynika także z pokaźnej liczby zebranej literatury przedmiotu, na którą składają się zarówno kluczowe pozycje, jak i najnowsze doniesienia.

Ogólnie rozprawę doktorską Pani mgr Barbary Mních oceniam wysoko, jako oryginalną, a uzyskane wyniki za bardzo wartościowe. Moje uwagi krytyczne, często techniczne, nie umniejszają wartości pracy. W związku z tym stwierdzam, że oceniana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane dysertacji doktorskiej i wnoszę do szanownej Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie, ze względu na oryginalność podjętego tematu, zaawansowaną i kompleksową metodologię, wysoką merytoryczną wartość oraz walory poznawcze, wnioskuję o wyróżnienie niniejsze rozprawy.

Prof. Sławomir Koziel



Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej  
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu