

Prof. dr hab. Krzysztof W. Nowak
Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań
tel.: 0 61 846 6082 lub 0 61 848 7196
fax: 0 61 848 7197
e-mail: kwnowak@up.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Anny Kotuni pt. „*Rola egzogennej greliny w regulacji dojrzewania jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt*”

**wykonanej w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem Prof. dr. hab. Romualda Zabielskiego**

Okres okołourodzeniowy jest jednym z najtrudniejszych okresów w życiu ssaków. Zmiana środowiska życia i związane z nią zmiany sposobu oddychania, wydalania i odżywiania stanowią olbrzymie wyzwania dla noworodka. Nie dziwi zatem szczególne zainteresowanie tym okresem życia, które narasta w ostatnich latach. Przetawienie organizmu noworodka z odżywiania przez krążenie łożyskowe na pobieranie pokarmu przez przewód pokarmowy pociąga za sobą szereg zmian strukturalnych i funkcjonalnych. W początkowym okresie przewód pokarmowy stanowi tylko częściową barierę pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a wewnętrznym, która to bariera z upływem czasu ulega uszczelnieniu, aż do uzyskania pełnej izolacji obu tych środowisk. Zjawisko „zamykania” przewodu pokarmowego jest interesujące samo w sobie, a jego regulacja nie jest ciągle dobrze poznana.

Proces „zamykania” przewodu pokarmowego może, przynajmniej teoretycznie, być regulowany od strony noworodka jak i od strony światła przewodu. Jeśli dodatkowo wziąć pod uwagę złożoność składu pokarmu osesków, czyli mleka, otwiera się bardzo szeroka gama możliwości oddziaływania na przewód pokarmowy od strony jego światła.

Informacje o występowaniu w mleku, a szczególnie w sianie, wielu hormonów pojawiają się bardzo szybko po opisanu tych hormonów. Właśnie badaniem potencjalnej roli tych nowo



odkrywanych hormonów w regulacji dojrzewania przewodu pokarmowego od dłuższego czasu zajmuje się Profesor Romuald Zabielski wraz ze swymi młodymi współpracownikami. Na zakończenie tego wstępu pragnę podkreślić wyjątkową rangę zagadnienia, któremu poświęcona recenzowana rozprawa doktorska. Badania procesu dojrzewania przewodu pokarmowego mają bardzo duże znaczenie praktyczne tak dla hodowli zwierząt jak i dla medycyny. Użycie w tych badaniach prosiąt jako modelu jest wyjątkowo trafne i pozwala z dużą dozą prawdopodobieństwa przenosić ich wyniki do neonatologii.

Maszynopis pracy przedstawionej do oceny liczy 150 strony i zawiera 33 ryciny oraz 24 tabele. W pracy wykorzystano 411 pozycji literatury, z czego ponad 29% pochodzi z ostatnich pięciu lat. Całość pracy została podzielona na siedem rozdziałów z podrozdziałami, które poprzedzono streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów.

Pierwszą część pracy stanowi obszerny **wstęp** liczący 43 strony. W rozdziale tym Autorka opisała wszystkie zagadnienia niezbędne dla zrozumienia pracy doktorskiej. Opis ten obejmuje informacje na temat greliny i jej receptora oraz roli tego hormonu, ze szczególnym uwzględnieniem przewodu pokarmowego. Również w tym rozdziale podane zostały informacje dotyczące rozwoju przewodu pokarmowego wraz z regulacją tego procesu. Rozdział ten jest napisany w sposób zrozumiały i świadczy o dobrym rozeznaniu Doktorantki w studiowanej tematyce.

Po przedstawieniu aktualnego stanu wiedzy dotyczącej tematyki pracy doktorskiej Autorka przedstawiła w sześciu punktach **cele** jakie stawiała sobie w trakcie jej realizacji. Doktorantka postanowiła na wstępie sprawdzić *(i)* występowanie/koncentrację greliny w mleku loch oraz w krwi loch i osesków, a także w preparatach mlekozastępczych. Następnie przeprowadzone zostały badania *(ii)* wpływu egzogennej greliny i antagonisty jej receptora na parametry morfologiczne przewodu pokarmowego noworodków oraz *(iii)* przebadano kinetykę dojrzewania błony śluzowej jelita cienkiego pod wpływem egzogennej greliny i antagonisty jej receptora, w tym *(iv)* dynamikę przebudowy nabłonka jelita czczego. Na zakończenie przebadano wpływ egzogennej greliny na *(v)* uszkodzenia DNA i *(vi)* mechanizmy indukcji apoptozy.

W rozdziale trzecim „**Materiał i metody**” opisane zostały kolejno trzy doświadczenia wraz z opisem stosowanych metod. Rozdział ten jest zasadniczo dobrze napisany, zawiera pełne opisy doświadczeń i stosowanych metod oraz analizy statystycznej. Szczegółowe uwagi dotyczące jego niedociągnięć przedstawię w dalszej części recenzji.

Rozdział czwarty obejmuje omówienie **wyników**, również zgodnie z kolejnością doświadczeń i postawionych celów. Wyniki są opisane wyczerpująco i dobrze zilustrowane. Ryciny i tabele zawierają wszystkie informacje niezbędne do ich analizy. Uwagi dotyczące tego rozdziału również przedstawię w dalszej części oceny.

Kolejny, piąty rozdział obejmuje **dyskusję** uzyskanych wyników. Również w tym rozdziale treść została podzielona zgodnie z kolejnością przeprowadzanych doświadczeń. Mgr Kotunia z dużą swobodą konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi literaturowymi, co jest dowodem na osiągnięcie dojrzałości naukowej. W rozdziale tym brakuje mi jednak krótkich podsumowań po zakończeniu dyskusji każdego doświadczenia. Taki sposób podsumowywania dyskusji, szczególnie w pracach wielowątkowych jakimi są często prace doktorskie, pomaga usystematyzować własny wkład do danego zagadnienia. Ułatwia to czytanie pracy doktorskiej, szczególnie jeśli jest ona obszerna.

Po rozdziale „Dyskusja” Doktorantka zamieszcza rozdział „**Podsumowanie i wnioski**”, w którym w dziewięciu punktach dokonuje rekapitulacji uzyskanych wyników. Mgr Kotuna stwierdziła zatem, że **(i)** siara i mleko loch zawierają znaczące ilości greliny, podczas gdy preparaty mlekozastępcze są ubogie pod względem zawartości tego hormonu; **(ii)** stężenie greliny we krwi osesków ulega zmianom, przyjmując najwyższe wartości w 7 dobie życia; **(iii)** egzogenna grelina obniża masę ciała i niektórych narządów, a jej antagonistą nie znosi tego działania; **(iv)** egzogenna grelina wywiera efekt troficzny na mięśniówkę żołądka, a jej antagonistą znosi to działanie; **(v)** wystawienie błony śluzowej jelita cienkiego na działanie greliny skutkuje spowolnieniem jej dojrzewania **(vi)** z równoczesnym spowolnieniem proliferacji i nasileniem procesów apoptozy (indukcja ścieżki TNF- α i TGF- β 1) i autofagii; **(vii)** wzmożona ekspresja p53 i aktywnej kaspazy 3 świadczą o nasileniu uszkodzeń DNA w nabłonku jelita po dożołądkowym podaniu greliny, wpływ ten jest znoszony przez antagonistę greliny.

Wyżej wymienione obserwacje doprowadziły Autorkę do sformułowania wniosku, że **grelina wprowadzona do przewodu pokarmowego (np. z mlekiem) spowalnia proces przebudowy nabłonka i w konsekwencji opóźnia proces dojrzewania jelita u noworodka**. Jest to działanie specyficzne, gdyż znosi je podanie antagonisty tego hormonu.

Uwagi

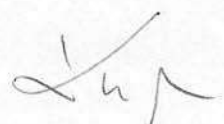
- W opisie metody radioimmunologicznego oznaczania hormonów Autorka nie podała bardzo istotnych informacji dotyczących stosowanego systemu. Przy opisie metodyki RIA niezbędne jest obliczenie i podanie błędu wewnątrz- i między- seryjnego. Bardzo ważne jest również opisanie jak wyglądała reakcja krzyżowa stosowanych przeciwciał w stosunku do pokrewnych peptydów. O ile pierwsze z przytoczonych parametrów RIA wymagają obliczeń, to krzyżowość przeciwciał jest zwykle charakteryzowana przez producenta.
- W odniesieniu do prezentacji wyników, jako osoba zajmująca się od bardzo dawna endokrynologią, chcę zwrócić Doktorantce uwagę na konieczność przedstawiania stężenia hormonów w stężeniach molowych. Choć pewnie dla wszystkich jest oczywiste, że hormony oddziałują cząsteczką a nie masą, to jednak dość powszechnie spotykam się w pracach z wyrażaniem ich stężenia w ilości substancji. Szczególnie utrudnia to interpretację wyników, gdy stężenie jednej substancji jest podawane w molach a drugiej w jednostkach masy, a tak zostało to zrobione w odniesieniu do antagonisty receptora greliny i greliny. Oczywiście czytelnik może dokonać przeliczenia, ale znacznie wygodniej jest, gdy tego przeliczenia dokona jednokrotnie Autor, niż każdorazowo czytelnik.

Obok tych istotnych uwag, do których proszę by Autorka ustosunkowała się w trakcie obrony, pragnę przytoczyć przykładowo drobniejsze uchybienia, takie jak:

- cytowania prac bez zachowania chronologii czasowej (np. s. 15 w. 11 od dołu, s. 107 2 w. od dołu),
- czy zapis masy cząsteczkowej jako wartości mianowanej (str. 18 w. 15 od góry).

Wszystkie wyżej przytoczone uwagi nie obniżają wartości naukowej ocenianej pracy. Można je potraktować jako niedociągnięcia, które zdarzają się również znacznie bardziej doświadczonym badaczom.

Reasumując, pragnę zaznaczyć, że przedstawiona do oceny praca została dobrze zaplanowana, obudowana bogatym warsztatem badawczym i bardzo klarownie napisana. Wyniki uzyskane w trakcie jej realizacji są bardzo interesujące, nowatorskie, dobrze udokumentowane i wnoszą wiele istotnych informacji do wiedzy o dojrzewaniu przewodu



pokarmowego. Ponownie podkreślam, że wyniki te, obok znaczenia poznawczego, mają istotne znaczenie praktyczne tak dla nauk o zwierzętach jak i medycyny.

Na zakończenie stwierdzam z pełnym przekonaniem, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Anny Kotuni pt. *„Rola egzogennej greliny w regulacji dojrzewania jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt”* spełnia wymogi stawiane przez **USTAWĘ O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65 poz. 595 z 2003 roku z późniejszą poprawką Dz. U. nr 164 poz. 1365 z 2005 roku)** i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Anny Kotuni do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Augustyna', with a stylized flourish extending from the end.

Poznań, dnia 17 maja 2009 roku