

Kraków, 22.04.2009

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

Temat rozprawy doktorskiej mgr Anny Kotuni dotyczy tematu aktualnego w gastroenterologii, chorobach metabolicznych jak i farmakologii działania greliny intensywnie badanej w ostatniej dekadzie i to zarówno w zakresie fizjologicznym, patofizjologicznym jak i biochemicznym.

Mimo intensywnych badań mechanizmy przyjmowania pokarmu oraz ich wpływ na rozwój dojrzewanie i regenerację przewodu pokarmowego są w centrum zainteresowania ze względu na dostępność coraz to nowych peptydów. O ile mechanizmy działania i rola klasycznych hormonów przewodu pokarmowego jest w dużej mierze poznana i to w zakresie ich działania na rozwój przewodu pokarmowego oraz jego dojrzewanie o tyle udział hormonów spoza tego zakresu jest słabo poznany. Doskonałym tego przykładem są badania nad produkowaną głównie w przewodzie pokarmowym, choć nie tylko, greliną.

Rola greliny w regulacji przyjmowania pokarmu jest po części określona, ale badania nad jej wpływem na dojrzewanie przewodu pokarmowego jest tylko częściowo poznana na modelach zwierzęcych, a prawie w ogóle nie u ludzi. Zadaniem przedstawionej do oceny pracy było określenie wpływu wyżej wymienionego peptydu zawartego w sianie i mleku loch oraz egzogennej na parametry morfometryczne, rozwój i funkcję jelita cienkiego i żołądka z szczególnym uwzględnieniem działania blokującego antagonisty receptora dla greliny- [D-Lys3]-GRP-6

Przedstawiony mi do oceny maszynopis pracy liczy 154 strony i zawiera: 32 ryciny i 21 tabel. Ryciny są czytelne w większości kolorowe znacznie ułatwiają obserwację uzyskanych wyników, tabele są przejrzyste. Część rycin jest jednak raczej obrazami histologicznymi i jako takie powinny być podpisane „obraz mikroskopowy” Piśmiennictwo jest niezwykle obszerne jak na ten typ opracowania, obejmuje 411 pozycji i jest aktualne. Układ pracy jest typowy dla tego rodzaju opracowań, poprawny, przejrzysty i podzielony na siedem części.

Wstęp jest obszerny, dopracowany do szczegółów, które niekiedy przekraczają zakres potrzebny do planowanych badań i posiada nawet rys historyczny. Podzielony został na 2 części główne i szereg podpunktów. W sposób wyczerpujący Autorka omawia w nim znaną wiedzę o grelinie, jej receptorze, stężeniu, znanej już aktywności oraz jej antagoniście. Osobno podane zostały wybrane aspekty rozwoju i czynności przewodu pokarmowego we wczesnym okresie postnatalnym. Na szczególną uwagę zasługuje obok nowoczesnego omówienia roli greliny piękne tego graficzne (ryciny i schematy) poparcie. W całości wstęp opracowany jest kompleksowo ze znajomością warsztatu a recenzent mógł się dowiedzieć kilku nowych interesujących informacji nie tylko z zakresu zaplanowanych badań.

W następnej części pracy Autorka zwięźle precyzuje cel badań. Było nim: wyjaśnienie wpływu, egzogennej greliny na rozwój układu pokarmowego prosiąt ze szczególnym uwzględnieniem jelita cienkiego. Podane zostały także cele szczegółowe w sześciu podpunktach.

W dalszej części pracy Autorka przedstawia materiał i metodykę badań. Przeprowadzono je na prosiątach. Wykonano ocenę stężenia greliny w sianie, mleku i osoczu loch oraz w osoczu prosiąt. Badano wpływ egzogennej greliny na rozwój jelita cienkiego nowonarodzonych prosiąt. Ocenione zostało działanie antagonisty receptora dla greliny [D- Lys3]-GRP-6 po podaniu egzogennej greliny. Osobno w sposób wyczerpujący i prawidłowo zostały omówione zastosowane procedury doświadczalne, niezwykle trudne i wymagające doskonałego warsztatu do badań między innymi: analiza immunofluorescencyjna, ilościowa ocena techniką cytometrii tkankowej, badania histologiczne, oznaczenie ekspresji białek

markerowych czy oznaczanie aktywności enzymów. Szczególnie doskonale pod względem technicznym są opracowania z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Omówiona została w sposób wyczerpujący po poszczególnych etapach analiza statystyczna uzyskanych wyników.

W następnej części pracy mgr Anna Kotunia omawia wyniki swoich badań. Wyniki te są szczegółowo przedstawione na załączonych rycinach. Całość wyników przedstawiona została z podziałem na podrozdziały zgodne z planowanymi badaniami. Osobno przedstawiono stężenia aktywności greliny u loch i prosiąt. Szczególnie dużą wartość poznawczą w tej części badań mają wyniki wykazujące znamienne wzrost greliny w osoczu u prosiąt karmionych przez matkę i to do wyższego poziomu niż w mleku matki.

Także interesujące są wyniki z drugiej części z podawaniem egzogennej greliny. Tu wydaje się być istotnym wykazanie zmniejszenia grubości błony śluzowej i masy jelita u prosiąt po egzogennej grelinie, choć brak tu zmian zależnych od dawki jeśli chodzi o grubość błony śluzowej gdy inne mierzone parametry to wykazują. Sumarycznie jest to niezwykle obserwacja wskazująca, że egzogenna grelina może spowalniać kinetykę dojrzewania błony śluzowej, co jest udokumentowane większością zastosowanych w pracy metod. Jest według recenzenta bardzo istotnym wykazanie pobudzenia ścieżki receptorowej apoptozy w enterocytach zależnej od TNF- α i TGF- β 1.

Trzecia część dotycząca antagonisty receptora greliny jest także ciekawa bo fakt odwracania działania greliny jest oczywisty, ale dodatkowy efekt znamiennego spadku przyrostu masy ciała prosiąt po samym antagoniście greliny jest zastanawiający.

Sumarycznie wyniki recenzowanej pracy wskazują jednoznacznie na to, że grelina jest wysoce aktywnym czynnikiem odgrywającym rolę w regulacji dojrzewania i funkcji jelita cienkiego i wskazuje na potencjalną możliwość zastosowania jej w modyfikacji rozwoju i leczeniu przewodu pokarmowego.

Umieszczone w tekście ryciny są obszernie podpisane, kolorowe, czytelne, przez co pozwalające dobrze śledzić opisywane parametry.

Dyskusja jest obszerna. Autorka omawia uzyskane wyniki i porównuje z dostępnym piśmiennictwem. Dyskusja podzielona jest na części odpowiednio osobno omawiając efekty poszczególnych etapów pracy. W ciekawy sposób autorka interpretuje wyniki z drugiej części badań dotyczące egzogennej greliny gdzie sugeruje różnoczasowy wpływ greliny od matki i własnej - endogennej oraz sugestia o „przygotowaniu” przewodu pokarmowego do dalszych etapów życia. Autorka jest ostrożna w ocenie wyników i w sposób wyważony omówione zostały wszystkie własne wyniki na tle doniesień innych autorów.

Wnioski podaje autorka w odrębnej części pracy, jest ich 9. Najistotniejszy wydaje się być, że grelina mleka matki spowalnia procesy przebudowy nabłonka i tym samym dojrzewanie jelita nowo narodzonych prosiąt.

Do pracy dołącza autorka streszczenie, zawierające między innymi, cele pracy, elementy metodyki, najważniejsze wyniki oraz wnioski.

Dołączone jest też krótkie streszczenie w języku angielskim.

Praca zaopatrzona jest w niezwykle obszerny spis skrótów, które ułatwiają zrozumienie tekstu pracy.

Ostatnią część stanowi niezwykle obszerne piśmiennictwo obejmujące, jak wspomniano, 411 pozycji, w których autorka podaje pełne tytuły cytowanych prac.

Omawiana praca mgr Anny Kotuni przedstawia wyniki wielostronnych badań, które mają duże znaczenie w regulacji fizjologicznej i dojrzewaniu przewodu pokarmowego, przez co posiadają znaczące implikacje praktyczne. Autorka w oryginalny sposób stara się wyjaśnić na drodze doświadczalnej mechanizmy regulujące te procesy. Przeprowadzone badania są trudne w realizacji i co należy zaznaczyć wymagają staranności, dobrego opanowania warsztatu badawczego i nakładów finansowych. Praca napisana jest poprawnym i zrozumiałym

językiem. Na podstawie wstępu i dyskusji można stwierdzić, że autorka posiada wszechstronną znajomość stanu wiedzy dotyczącej fizjologii i farmakologii przewodu pokarmowego. Z wstępu, jak wspomniałem wcześniej, można się bardzo wiele nauczyć. Autorka potrafiła jasno i konkretnie postawić cele i założenia pracy, przy czym cele ten wynikają z omówionego we wstępie stanu obecnej wiedzy w tej dziedzinie.

Na szczególne podkreślenie zasługuje nowoczesna metodyka zastosowana w badaniach wymagająca obok wiedzy teoretycznej także zdolności manualnych.

Wyniki przedstawia autorka zwięźle, posługując się dobrze opracowanymi wykresami ułatwiającymi orientację w przeprowadzonych badaniach.

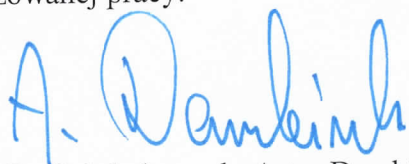
Czytając tekst pracy doktorskiej mgr Anny Kotuni natrafia się na pewne usterki i w związku z tym nasuwają się pewne uwagi:

1. Nie opisano w sposób wystarczający przy rycinach oznaczeń znamienności statystycznej. Względem czego jest „a” czy „b” nie zawsze jest jasne.
2. Zarówno grelina jak i jej antagonisty wykazują momentami podobne działanie, może antagonisty jest zarazem częściowym agonistą? Najlepiej to widać w zmianach masy zwierząt i narządów. Nie zostało to wystarczająco omówione w dyskusji.
3. Grelina podawana była dożołądkowo ciekawym byłby opis jej dożylnego czy dootrzewnowego podania – jest to nie uwaga, ale sugestia.
4. Brak jest jaśniejszego ustosunkowania się do zastosowanych dawek greliny. Jak rozumieć wynikło to z badań innych autorów, co częściowo poruszono w dyskusji.
5. Numerowanie rycin jest nietypowe, rozpoczynają się numerem podrozdziału. Ułatwia to ich znalezienie, ale nie jest powszechne w publikowanych pracach.
6. Brak w spisie opisu podrozdziałów dyskusji, choć są obecne w tekście.

Podsumowując uwagi na temat rozprawy doktorskiej mgr Anny Kotuni uważam, że stanowi ona bardzo wartościowy wkład w naszą wiedzę o grelinie, a także rozwoju i dojrzewaniu jelit prosiąt. Dzięki zastosowanej nowoczesnej technice i modelom doświadczalnym zwierząt poszerza naszą wiedzę w sposób znaczący. Recenzent ma świadomość, że zastosowane badania są trudne i oznaczenia wymagają kosztownej unikalnej aparatury. Wysoko oceniam sposób analizy badanego problemu, który jest niezwykle przejrzysty uwzględniając szerokość wykonanych doświadczenia.

Wymienione wcześniej pewne niewielkie usterki są natury jedynie formalnej i zwykle towarzyszą tego typu opracowaniom i nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej pracy, którą oceniam bardzo wysoko i uważam za odpowiadającą w pełni wymogom stawianym rozprawom doktorskim w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i stawiam wniosek do Wysokiej Rady o dopuszczenie mgr Anny Kotuni do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę temat i sposób rozwiązania postawionego problemu raz doskonale opanowanie warsztatu badawczego i wnioskuję także do Wysokiej Rady o wyróżnienie recenzowanej pracy.



Prof. dr hab. med. Artur Dembiński