

dr hab. Ewa Tomaszewska prof. UP

Lublin, 08.05.2019 r.

Katedra Fizjologii Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja

Rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Agnieszki Leus

„Zmiany rozwojowe struktury histologicznej i bariery jelitowej dwunastnicy jako efekt prenatalnej suplementacji kwasem 3-hydroksy-3-metylomasłowym w modelu zwierzęcym”

wykonanej w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii Instytutu Biologii i Biochemii na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem Promotora Pana dr hab. n. biol. Piotra Dobrowolskiego profesora uczelni przy wsparciu Promotora pomocniczego Pana dr hab. n. wet. Siemowita Muszyńskiego z Katedry Fizyki Wydziału Inżynierii Produkcji Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie z dnia 26 października 2018 roku.

Kwas 3-hydroksy-3-metylomasłowy (HMB) powstaje endogennie u ludzi i zwierząt jako metabolit leucyny, egzogenne aminokwasu, który posiada rozgałęziony boczny łańcuch alifatyczny. HMB jest przekształcany do beta-hydroxy-beta-metyloglutarylo-Co-A (HMG-CoA) głównie w cytoplazmie komórek mięśniowych i wątrobowych, gdzie może zostać użyty do produkcji cholesterolu. Zakłada się, że uszkodzone lub obciążone komórki mięśniowe nie są w stanie wytworzyć wystarczającej ilości HMG-CoA żeby zapewnić syntezę cholesterolu na takim poziomie, który będzie umożliwiał prawidłowe funkcjonowanie komórek i prawidłową strukturę błon komórkowych. W związku z powyższym, suplementacja HMB może być odpowiednim

sposobem na dostarczenie niezbędnego HMG-CoA. Potwierdzone licznymi badaniami na zwierzętach i wolontariuszach, wielokierunkowe korzystne działanie HMB, przyczyniło się do tego, że substancja ta powszechnie występuje na rynku suplementów. Występuje w postaci płynnej, kapsułek i proszku do rozpuszczania. Zalecana jest głównie dla początkujących sportowców, u których ma zapobiegać negatywnym skutkom katabolizmu po wysiłku. Brak jest jednak opinii odnośnie działania HMB w okresie prenatalnym. Generalnie nie uzyskano dotychczas w pełni wyczerpujących informacji o procesach wzrostu i dojrzewania w okresie prenatalnym oraz możliwościach ingerencji w ich przebieg. Wiadomo jednak, że w okresie życia płodowego wrażliwość rozwijających się struktur narządowych jest wyjątkowo duża i nawet najmniejsza ingerencja farmakologiczna upośledza lub hamuje prawidłowy rozwój organizmu, albo przyspiesza dojrzewanie poszczególnych układów i narządów. Koniecznym dlatego jest podejmowanie badań, w których jest możliwość oceny efektów działania HMB jako czynnika programującego, które byłyby podstawą do podjęcia prób na wykorzystanie HMB w celu przyspieszenia dojrzewania przewodu pokarmowego u nowonarodzonych dzieci, co mogłoby być ważnym elementem w różnorodnych terapiach u tych dzieci, których powodzenie zależne jest od funkcji i struktury przewodu pokarmowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Leus została napisana w języku polskim i przedstawiona do recenzji w postaci wydruku komputerowego na 78 stronach formatu A4. Układ dysertacji jest tradycyjny i zawiera: spis treści, wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis ilustracji i tabel oraz wykaz piśmiennictwa. Rozprawa zawiera 15 rycin nazwanych figurami, 5 tabel i 114 pozycji piśmiennictwa, w większości anglojęzycznego. Szata graficzna jest staranna i estetyczna.

We „Wstępie” obejmującym 9,5 strony Doktorantka w klarowny sposób wprowadza czytelnika w tematykę badawczą, gdzie 4 strony poświęciła na ogólną charakterystykę jelita cienkiego; na 3 stronach opisała zastosowany metabolit leucyny prezentując jego budowę na rycinie; następnie na 1 stronie omówiła zalety zastosowania świni domowej jako modelu zwierzęcego w badaniach. W części dotyczącej HMB Doktorantka zwróciła uwagę, że do chwili obecnej nie ma żadnych informacji na temat metabolitu leucyny jako czynnika programującego rozwój i czynność jelita cienkiego zarówno u świni domowej jak i człowieka, dla którego świnia jest doskonałym zwierzęciem modelowym. Rozdział ten zawiera aktualne dane ze światowej literatury, co świadczy o dużej wiedzy Doktorantki i umiejętnościach doboru materiału do opisanych zagadnień.

W rozdziale „Cel pracy”, Doktorantka postawiła 4 cele badawcze, które pozwolą jej zweryfikować hipotezę o możliwości przyspieszenia rozwoju, dojrzewania i zdolności adaptacyjnych jelita cienkiego (dwunastnicy) w okresie zmiany formy żywienia z płynnej mlekiem matki na stały pokarm u potomstwa matek otrzymujących HMB w okresie ciąży. Doktorantka zaplanowała również zbadanie czy efekty prenatalnego oddziaływania HMB są zależne od płci potomstwa.

Do osiągnięcia zamierzonych celów zaplanowała doświadczenie obejmujące dwie grupy doświadczalne matek liczące sumarycznie 12 sztuk po 2-3 przebytych porodach, które były podzielone na grupę kontrolną i doświadczalną otrzymującą HMB w ilości 0,2 g/kg masy ciała w okresie od 70. do 90. dnia ciąży. Po porodach, potomstwo uzyskane od matek z grupy kontrolnej stanowiło grupę kontrolną samców i samic, a potomstwo urodzone przez matki suplementowane HMB stanowiło grupę HMB samców i samic. Moment zmiany formy żywienia z płynnej na stałą przypadał w wieku 35 dni. Doktorantka zawarła stosowną informację na temat pozwolenia komisji etycznej.

Rozdział „Materiały i Metody” zawiera szczegółowy opis użytych materiałów, stosowanych metod i technik. Obejmuje on 19,5 strony i zawiera 11 rycin i 1 wzór matematyczny. Szczegółowe przedstawienie procedur metodycznych z łatwością pozwoli osobie biegłej w technikach histologicznych i mikroskopowych oraz wykonujących testy ELISA bez trudu odtworzyć badania.

Do analizy statystycznej istotności wyników zastosował odpowiednie testy zgodnie ze sztuką statystyczną.

W rozdziale „Wyniki” zajmującym 7,5 strony, Doktorantka przedstawiła na 3 rycinach i w 5 tabelach uzyskane wyniki. Należy podkreślić, że prezentowane mikrografie wskazują, że Doktorantka bardzo dobrze opanowała warsztat i swobodnie posługuje się nowoczesnymi technikami badawczymi.

W rozdziale „Dyskusja” przeprowadzonym na 10 stronach, Doktorantka skonfrontowała swoje wyniki z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i w jasny sposób wyeksponowała swoje oryginalne wyniki, co dowodzi dobrego opanowania warsztatu pisarskiego i czytania, umiejętności kierowania logicznym wywodem i celnego dobierania argumentów z literatury. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała 4 wnioski końcowe ściśle dotyczące postawionych przez siebie celów badawczych.

„Piśmiennictwo”. W rozdziale tym Doktorantka zestawiała interesujące pozycje piśmiennictwa, do których w umiejętny sposób się odniosła zarówno we wstępie jak i dyskusji. Zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej zostały poparte odpowiednio dobranym piśmiennictwem. Spis piśmiennictwa zawiera 114 pozycji, z których znaczna ilość to prace oryginalne. Zakres podanego piśmiennictwa świadczy o tym, że Doktorantka dokładnie zapoznała się z obecnym stanem wiedzy związanym z podjętą tematyką prenatalnego programowania z zastosowaniem HMB.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na drobne niedopatrzenia, które powinny zostać poprawione przy oddaniu pracy do druku.

W całej dysertacji Doktorantka przyjęła system cytowań, w którym publikacje są wymieniane w kolejności rocznika. We wstępie opisując użyty związek chemiczny na stronie 13, Doktorantka pisze: „Zalecana jest dla początkujących zawodników, u których ma zapobiegać negatywnym skutkom katabolizmu po wysiłku (Nissen S.L. i Abumrad N.N., 1997; Nissen i in., 2000; Hmb, 2005; Tataro i in., 2012; Nunes i in., 2008; Tataro i in., 2008; Śliwa i in., 2010a; Wilson i in., 2013; Molfino i in., 2013; Szcześniak i in., 2015; Blicharski i in., 2017; Cieśkał i Nieradko-Iwanicka, 2018).” Wyliczając przytoczone referencje, Doktorantka pogubiła się w czasie oraz zgubiła nazwisko, gdyż w cytowaniu „Hmb, 2005” Hmb nie jest nazwiskiem. Proszę podać poprawnie cytowanie.

Na stronie 14 Doktorantka pisze: „Powyższe dane pozwalają na wsunięcie hipotezy..”. Chyba chodzi o wysunięcie hipotezy.

Na stronie 15, Doktorantka pisze: „Wielką zaletą tego gatunku są niskie koszty hodowli, ciąża trwa stosunkowo krótko, a mioty są liczne, ponadto wykorzystywanie tego gatunku do badań budzi znacznie mniejsze kontrowersje niż w przypadku naczelnych.” Jestem w stanie zgodzić się, że użycie świni domowej w doświadczeniach jest mniej kontrowersyjne niż użycie przedstawicieli naczelnych, ale koszt utrzymania świni oraz ilość czynnika, jaka musi zostać podana w przeliczeniu na masę ciała to koszty bardzo wysokie, które powodują, że coraz rzadziej w tego typu doświadczeniach stosuje się ten gatunek. Ciąża jest krótka, ale zależy to od punktu widzenia, ponieważ porównując z ciążą u człowieka faktycznie jest krótsza, ale w porównaniu z ciążą u szczurzy czy kawi to jest to najlepszy model do tego typu badań.

Na stronie 21, Doktorantka używa określenia „kontra barwienie”. Lepsze jest – barwienie kontrastowe.

Strona 22, jest zdanie: "Do oceny reakcji immunohistochemicznych oraz zliczanie komórek apoptotycznych...". Powinno być: „Do oceny reakcji immunohistochemicznych oraz liczenia komórek apoptotycznych...”

W opisie „Ocena splotów nerwowych dwunastnicy” Doktorantka powołuje się na metodę pomiaru powierzchni przekroju, kształtu i średniej średnicy Fereta podając tylko cytowanie. Powinien być podany pełny opis.

W rozdziale „Wyniki”, rezultaty są przedstawione w Tabelach. Mały znacznie rozmiar czcionki zastosowanej w tabelkach znacząco odbiega od wielkości czcionki pozostałego tekstu i sprawia, że tabelko stają się trudne do czytania.

Na stronie 40, jest zdanie: „Podobnie całkowita grubość błony mięśniowej była istotnie większa.” Zdanie to wydaje się być urwane.

W rozdziale „Wnioski” Doktorantka podaje 4 wnioski. Wnioski trzeci i czwarty należy połączyć w jeden wniosek.

W „Streszczeniu” zdanie : „Prenatalne podawanie kwasu 3-hydroxy-3-metylomasłowego stymuluje rozwój dwunastnicy na poziomie zmian strukturalnych i funkcjonalnych u potomstwa w okresie odsadzenia.” wymaga przeredagowania. Jeżeli piszemy, że zmiany są u potomstwa to musimy się odwołać do podawania HMB jego matkom. Jeżeli piszemy krótko, że prenatalne ekspozycja to zdanie należy przeredagować tak, aby nie używać słowa potomstwo w tym kontekście.

Literatura jest pisana z użyciem pełnych nazw czasopism. Jednak w pozycji 27 i 71 został podany skrót czasopisma.

Pomimo staranności Doktorantki, w pracy znajdują się błędy interpunkcyjne.

Po zapoznaniu się z przedłożoną mi do oceny rozprawą doktorską, stwierdzam, że jest to bardzo interesujące opracowanie, które skłania do zadania Doktorantce pytań:

1. Czy uważa, że świnia domowa jest wystarczającym modelem do tego typu badań?

2. Czy uzyskane wyniki można przenieść w sposób jednoznaczny na ludzi i wprowadzić program profilaktyki ciężarnej z suplementacją HMB?

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr inż. Agnieszki Leus uważam, że Autorka pracy posiadała wymaganą znajomość warsztatu metodycznego, potrafi te umiejętności odpowiednio wykorzystać w pracy eksperymentalnej, a otrzymane wyniki logicznie zinterpretować. Uwagi krytyczne dotyczą jedynie drobnych usterek redakcyjnych i nie umniejszają wartości naukowej dysertacji.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Leus pt. "Zmiany rozwojowe struktury histologicznej i bariery jelitowej dwunastnicy jako efekt prenatalnej suplementacji kwasem 3-hydroksy-3-metylomasłowym w modelu zwierzęcym" 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) i przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Leus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Ewa Tomaszewska prof. UP