

Prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska  
Zakład Fizjologii Żywienia  
Katedra Dietetyki  
Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka  
i Konsumpcji SGGW  
w Warszawie

Warszawa, 14.01.2015 r.

## **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Świebody**

**pt. „Model zwierzęcy hiperoksalurii indukowanej zwiększoną podażą hydroksyproliny  
w diecie ”**

wykonanej w Instytucie Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie  
pod kierunkiem naukowym promotora dr hab. n. med. Rafała Filipa, prof. IMW

Przedłożona do recenzji rozprawa Pani mgr Pauliny Świebody dotyczy opracowania i scharakteryzowania pod kątem zarówno klinicznym, jak i biochemicznym zwierzęcego modelu hiperoksalurii – schorzenia nie tylko nerek, ale też – w konsekwencji całego organizmu.

Hiperoksaluria oznacza zwiększone wydalanie kwasu szczawowego w moczu, co wynika albo z genetycznie uwarunkowanych defektów enzymatycznych (hyperoksaluria pierwotna), albo z nadmiernego wchłaniania kwasu szczawowego w jelitach, bądź nadmiernego spożywania pokarmów bogatoszczawianowych (hiperoksaluria wtórna). Zwiększone stężenie szczawianów w moczu jest jedną z głównych przyczyn nawracającej kamicy układu moczowego lub postępującej nefrokalcynozy (wapnicy nerek), czyli odkładania się kryształów szczawianowo-wapniowych w nerkach. Jest to najczęściej podłożem powstawania kamieni nerkowych, a w konsekwencji – niewydolności nerek. Wskutek tego u wielu pacjentów z hiperoksalurią dochodzi do konieczności rozpoczęcia dializoterapii.

Biorąc powyższe pod uwagę wybór tematyki recenzowanej rozprawy jest jak najbardziej uzasadniony. Opracowanie wiarygodnego, w miarę stabilnego i stosunkowo łatwego do uzyskania eksperymentalnie modelu hiperoksalurii (doświadczenie I prezentowane w rozprawie) oraz próba, przez odpowiednie postępowanie żywieniowe, enzymatycznego redukowania hiperoksalurii (doświadczenie II) budzi uznanie i, z utilitarnego punktu widzenia, jest na pewno ważne. Dyskusyjny jest natomiast wybór gatunku zwierzęcia modelowego, ale o tym w dalszej części recenzji.

## Charakterystyka ogólna i ocena formalna pracy

Przedstawiona do recenzji praca liczy 166 stron znormalizowanego maszynopisu. Rozprawa ma formę klasyczną. Składa się z „Wstępu”, który jest tak naprawdę „Przełęczem piśmiennictwa” – 42 strony, „Celów pracy” – pół strony, „Materiału i metod” – prawie 28 stron, „Wyników” – 48 stron, „Dyskusji” – 14,5 stron, „Wniosków” – 2 strony i „Spisu piśmiennictwa” – 19,5 stron. Tekst właściwy rozprawy poprzedza „Streszczenie” przygotowane w języku polskim (3 strony) i angielskim (3 strony). Ponadto w rozprawie zamieszczono ponad dwustronicowy „Wykaz stosowanych skrótów”.

Jak więc widać, Autorka największy nacisk położyła na przedstawienie wyników badań własnych i metodykę zastosowaną do ich uzyskania, bowiem te dwa rozdziały stanowią w sumie ponad 54% całej rozprawy.

Materiał ilustracyjny pracy stanowi 6 tabel (wszystkie zawarte w rozdziale „Wyniki”) oraz 41 rycin, w tym 6 zdjęć, z czego jeden rysunek znajduje się w „Przełęczu piśmiennictwa”), 4 w rozdziale „Materiał i metody”, a 34 ryciny (z czego 6 rycin to fotografie narządów *post mortem* (4 fotografie) i preparatów histologicznych – 2 zdjęcia obrazów mikroskopowych) zamieszczono w rozdziale „Wyniki”.

Cytowane piśmiennictwo liczy 244 pozycje, w większości anglojęzyczne (ponad 86%), opublikowane po 2000 roku (57%), w tym 8 pozycji z ostatnich 2 lat. Uważam, że Doktorantka niepotrzebnie, przy tak dobrze dobranym piśmiennictwie, psuje wrażenie nadmiernym cytowaniem podręczników – aż 20 pozycji, w tym wiele pozycji z dziedziny fizjologii. W rozprawach doktorskich raczej unika się cytowania podręczników, z wyjątkiem opisu jakiś klasycznych metod, jak np. technika histologiczna, gdzie rzeczywiście przez bardzo wiele lat nie wiele się zmieniło. Można powiedzieć, że też nie uległa zmianie budowa nerki, ale już jej funkcje – tak, bo wiemy o nich znacznie więcej niż przed laty.

Oceniając od strony formalnej i edytorskiej recenzowaną rozprawę należy stwierdzić, że jest ona przygotowana bardzo starannie, wyraźnie włożono niemały trud w usunięcie wszelkich usterek i błędów literowych, jak też bardzo starannie wykonano ilustracje graficzne. Pomimo tych ewidentnych pozytywów do strony formalnej pracy mam zastrzeżenia.

Po pierwsze, od razu na początku tej lektury zwraca uwagę nadmiernie rozbudowany, można powiedzieć w pewien sposób infantylny, „Wykaz stosowanych skrótów”. Po co w poważnym opracowaniu naukowym, jakim jest, a przynajmniej powinna być, rozprawa doktorska wyjaśniać tak powszechnie znane skróty, jak H<sub>2</sub>O; O<sub>2</sub>; CO<sub>2</sub>; symbole pierwiastków

(Ca) czy związków (NaCl), które są powszechnie znane, a także jednostki miary, jak litr czy metr kwadratowy, mol, mikromol itd. Takich niepotrzebnych moim zdaniem objaśnień naliczyłam 18 w spisie liczącym 72 nazwy, czyli ¼ całego spisu mogłaby być pominięta.

Po drugie – dziwi mnie zamieszczenie wniosków wynikających z wyników uzyskanych w badaniach (do sformułowania wniosków odniosę się w dalszej części recenzji) przed dyskusją tych wyników. Celem i rolą dyskusji jest szersze spojrzenie na wyniki własne, szczególnie w kontekście tego co stwierdzili i opisali inni badacze. To pozwala na spojrzenie z dystansu na wyniki własnych badań, a wobec tego sformułowanie prawidłowych wniosków. W układzie, jaki znajduje się w recenzowanej rozprawie, dyskusja wydaje się przysłowiowym „kwiatkiem do kozucha”.

Po trzecie – nieprawidłowa jest moim zdaniem wzajemna relacja wstęp teoretyczny – dyskusja. Te dwie części rozprawy, obie głównie oparte na wiadomościach zaczerpniętych z różnych źródeł literaturowych, powinny się równoważyć. W recenzowanej rozprawie tego elementu zabrakło: „Wstęp” jest bardzo długi (42 strony), a więc mocno „przegadany” w stosunku do mało rozbudowanej (nieco ponad 14 stron) Dyskusji. Do obu tych rozdziałów odniosę się jeszcze w merytorycznej ocenie rozprawy.

Po czwarte – zbyt długie, mało syntetyczne streszczenie rozprawy w obu językach, długie bo zawierające zbyt dokładny opis wyników. Jest to raczej podsumowanie niż streszczenie.

No i jeszcze na koniec tej części recenzji uwaga edytorska, która szczególnie dotyczy rozdziału „Wyniki”. Po co zostawiano całe fragmenty stron (wielokrotnie ponad 75%) puste, bez tekstu? W ten sposób niepotrzebnie „rozciągnięto” maszynopis, który powinien tworzyć zwartą całość, a graficzne ilustracje nie koniecznie muszą znajdować się bezpośrednio pod ich opisem. Przecież w tekście są stosowne odnośniki odsyłające czytelnika do odpowiedniej tabeli czy rysunku.

### **Ocena merytoryczna pracy**

#### Przegląd piśmiennictwa

Jak już zaznaczyłam wcześniej, ten rozdział rozprawy jest zbyt długi, niepotrzebnie zamieszczono w nim szczegółowy, oparty na starych podręcznikach akademickich (np. z 1989 r.) opis anatomii czy funkcji nerek. Niepotrzebnie też moim zdaniem „rozbito” tekst na liczne podrozdziały (szczególnie to razi na stronach 33 – 37 czy 41), często zajmujące tylko pół strony tekstu, albo nawet kilka zdań. Wystarczyło w tym przypadku dla podkreślenia

nowego wątku użyć akapitów. W tekście „sfokusowanym” na nerkach pojawiło się szereg nieścisłości i błędów rzeczowych. I tak na stronie 19 opisując budowę nerki Doktorantka, powołując się na kilka źródeł literaturowych, pisze: „W kanaliku nerkowym rozróżniamy dwie rozwojowo różne części: wydzielniczą czyli tzw., nefron oraz część wyprowadzającą tzw. cewkę zbiorczą”. Otóż jest to nieprawda, bo w skład nefronu wchodzi kanaliki (proksymalny, dystalny i pętla Henlego), a kanalik (cewka) zbiorczy pełni również funkcje wydzielnicze. W dalszej części tego rozdziału kolejne zdania są zaprzeczeniem stwierdzenia cytowanego. Najwyraźniej nastąpiło w tym miejscu jakieś przejęzyczenie. Na stronie 22 Autorka rozprawy wymienia hormony pochodzenia nerkowego, które regulują funkcje tego narządu. Co do regulacji – zgoda, natomiast zarówno endotelina, jak i tlenek azotu nie są pochodzenia nerkowego, tylko ich źródłem jest śródbłonek naczyniowy, której to struktury jest oczywiście w nerkach bardzo dużo. Na stronie 24 pojawia się rewelacja, że „nerki wydają hormony steroidowe, aminy katecholowe i hormony tarczycy”. Chyba Doktorantce chodziło o metabolity tych wszystkich związków, które rzeczywiście są wydalane w moczu?

Dobrze opisana jest natomiast część tego rozdziału poświęcona żywieniowym przyczynom kamicy nerkowej oraz dietoterapii tych schorzeń, a bardzo ciekawa i też dobrze opisana jest część „Wstępu” poświęcona dekarboksylazie szczawianowej, z użyciem której medycyna wiąże duże nadzieje. Prosiłabym przy okazji o podanie polskiej nazwy gatunkowej rośliny bogatej w szczawiany. Na podstawie podanej w rozprawie tylko nazwy łacińskiej (str. 58) nie bardzo wiem o jaką roślinę chodzi.

To czego zabrakło w tym rozdziale rozprawy to przedstawienia hipotez badawczych, których nie znalazłam też w innym miejscu. Trudno tu mówić o drobnym przeoczeniu, bowiem prawidłowe postawienie hipotezy/hipotez badawczych jest podstawą każdej pracy naukowej.

Drugim istotnym mankamentem tego rozdziału jest sposób cytowania poszczególnych pozycji piśmiennictwa. Panuje tu totalny chaos – ani alfabetycznie, ani chronologicznie, w każdym miejscu inaczej, a przecież zasadami cytowania rządzą określone reguły.

### Cele i metodyka pracy

W rozdziale „Cel pracy” Doktorantka przedstawia dwa cele – główny i dodatkowy. Co do tego pierwszego – uważam, że lepiej było użyć określenia „opracowanie modelu”, a nie, jak jest w rozprawie „wytworzenia modelu”. Zwierzęta nie były wytworzone tylko opracowano z ich użyciem model badawczy. To są oczywiście dewagacje semantyczne i można z nimi polemizować.

Nie zmienia to faktu, że cele prowadzonych przez Doktorantkę badań zostały nakreślone precyzyjnie i nie mam do nich zastrzeżeń. Natomiast polemizowałabym z argumentacją przemawiającą za doborem gatunku zwierzęcia modelowego. Oczywiście zgadzam się z argumentacją Pani magister Pauliny Świebody, że ...”świnie ... są wykorzystywane w badaniach biomedycznych ze względu na podobieństwo wielkości, struktury i funkcji ich narządów z narządami ludzkimi” z tym, że z tych przytoczonym powyżej argumentów najistotniejsza jest wielkość. Dotyczy to także nerek. Oczywiście, słuszne są stwierdzenia zamieszczone w rozdziale „Dyskusja” (str. 132), dotyczące podobieństw między organizmem człowieka i świni w aspekcie fizycznych parametrów funkcji nefronu czy właściwości fizycznych moczu. Jednak ten świetny skądinąd model ma zasadniczy mankament finansowy – badania na tym modelu nie dość, że są kosztowne to jeszcze wymagają odpowiedniego zaplecza. Trudno je sobie wyobrazić w przeciętnej jednostce naukowej. Jak sama Doktorantka pisze na stronie 50 i 132 rozprawy, najbardziej popularnym (i uznanym w piśmiennictwie światowym, w bazie PubMed pod tym hasłem jest prawie 300 artykułów) modelem hiperoksalurii są szczury laboratoryjne. „Świńskim” modelem hiperoksalurii zajmowali się w ostatnich latach badacze tylko z kilku ośrodków, m.in. *University of Wisconsin School of Medicine and Public Health*, cytowani zresztą, przynajmniej częściowo, przez Doktorantkę. Można więc powiedzieć, że Autorka rozprawy miała szczęście mogąc skorzystać z zaplecza hodowlanego w postaci gospodarstwa doświadczalnego Szwedzkiego Uniwersytetu Nauk Rolniczych, które umożliwiło wykonanie badań na sporej grupie (n=32) młodych, rosnących świń. Prosiłabym jednak o ustosunkowanie się porównawcze w szerokim aspekcie do dwóch modeli hiperoksalurii – szczurzego i świńskiego. Takiego elementu zabrakło mi w dyskusji wyników.

Metodyka pracy opisana jest bardzo drobiazgowo, a tok postępowania w obu, kolejno po sobie następujących doświadczeniach, przedstawiony został z wystarczającymi szczegółami. Opis obu doświadczeń uzupełniają bardzo dobre schematy (rycina 3 i 4). Pomimo podania tak szczegółowego opisu, a może właśnie dlatego, pojawiają się pytania. Po pierwsze: do doświadczenia wzięto zwierzęta bardzo młode, po odsadzeniu, które powinny intensywnie rosnać, a więc ich zapotrzebowanie na pasze było duże. Dlaczego więc karma była podawana tylko 2 razy dziennie w ograniczonej ilości (2% masy ciała), a nie *ad libitum*? Tłumaczenie Doktorantki znajdujące się na stronie 62, a dotyczące przeliczania ilościowego paszy nie bardzo mnie przekonuje. Przecież jest jednak pewne zindywidualizowanie zapotrzebowania. Po drugie – dlaczego grupa kontrolna w II doświadczeniu miała inną liczebność ? Po trzecie – na podstawie jakich przesłanek czy jakich wskazówek

literaturowych przyjęto w doświadczeniu schemat podawania hydroksyproliny? Po czwarte – dlaczego zwierzęta z grupy kontrolnej też otrzymywały w paszy hydroksyprolinę, a nie *palcebo*? Po piąte – dlaczego w doświadczeniu I „wypadło” aż 10 sztuk czyli 1/3 grupy. Tłumaczenie Doktorantki zamieszczone na stronie 66 rozprawy nie jest jasne, co to znaczy „eliminacja osobników nie spełniających wymaganych parametrów”? Jakich parametrów?. Prosiłabym o komentarz w tej sprawie. Na tej samej stronie znajduję określenie „sety”. Co to znaczy? Czy chodzi o podgrupy? Znowu proszę o wyjaśnienie.

Opis zastosowanych metod analitycznych oraz przygotowania próbek moczu, krwi, kału i treści pokarmowej jest prawidłowy i zawiera wszystkie niezbędne szczegóły. Zabrakło tylko jednego istotnego elementu, którego nie znalazłam w opisie metod. Czy zebrany materiał biologiczny rozdzielano na porcje i w porcjach zamrażano? Ta informacja jest bardzo istotna. Zabrakło mi też informacji o podawanych zwierzętom środkach analgetycznych. Nie sądzę aby stosowna komisja etyczna wydała zgodę na wykonanie doświadczenia bez ich użycia. Biorąc pod uwagę zdjęcia makroskopowe nerek w przekroju strzałkowym oraz opis zmian patologicznych zamieszczony w tabeli na stronie 91, zwierzęta musiały mieć bardzo silne dolegliwości bólowe.

Reasumując tę część recenzji muszę z uznaniem podkreślić ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę zarówno w wykonanie doświadczeń i opracowanie analityczne zebranego materiału, jak też w opracowanie statystyczne wyników.

### Wyniki i wnioski

Opis wyników wykonano osobno dla każdego doświadczenia. Analiza wyników doświadczenia I wykazała, że 4% zawartość (w/w) hydroksyproliny w paszy podawanej przez 4 tygodnie wywołuje hiperoksalurię u świń, która, po wycofaniu działającego czynnika cofa się, co według Autorki rozprawy sugeruje, i słusznie, odwracalność modelu. W doświadczeniu II, w wyniku podawania dekarboksylazy szczawianowej zwierzętom z hiperoksalurią, stwierdzono obniżenie wydalanych z moczem szczawianów przy równoczesnym obniżeniu ich stężenia w surowicy krwi i zmniejszeniu zmian patologicznych (złogi) w nerkach. Tak więc wyniki obu doświadczeń pozwoliły na osiągnięcie obu postawionych przez Doktorantkę celów. Należałoby tu dodać, że także na pozytywną weryfikację hipotez badawczych, ale hipotez w rozprawie nie ma.

Wyniki przedstawiono dość precyzyjnie, chociaż Autorka nie uniknęła pewnego błędu jakim jest tzw. podwójna prezentacja wyników – dane liczbowe są raz przedstawione w tekście, drugi raz – na rycinie albo w tabeli. Przy opisie dobowego wydalania szczawianów w

moczu (str. 102 – 107) jest to nawet potrójna prezentacja: opis, rysunki i na wszelki wypadek jeszcze tabela. Podobnie jest z określeniem istotności zmian – jest to podane w opisie w tekście i na ilustracji czy to graficznej, czy tabelarycznej. Bardziej zwarty opis, bez wartości liczbowych byłby klarowniejszy i łatwiejszy do zrozumienia.

W opisie rzędnej Y rysunku 2 jest ewidentna pomyłka. Wychodzi na to, że spożywaną przez prosięta karmę należy liczyć w setkach kilogramów. Na stronie 83 – czy chodzi tu o spożycie wody czy paszy? Na stronie 89 – podano stężenia szczawianów w osoczu, podczas gdy w opisie metod (str. 70) mówi się o otrzymywaniu surowicy. Gdzie jest więc prawda? Strona 94 o 95 – opis zmian przyrostów masy ciała w II eksperymencie nie odpowiada temu co ilustruje rycina. To nieprawda, że dynamika wzrostu była taka sama we wszystkich grupach, bo nie była. Szczególnie pod koniec doświadczenia grupa kontrolna wyraźnie różniła się od pozostałych. Również inne było spożycie paszy i wody. Na rycinie zamieszczonej na stronie 99 przy niektórych słupkach nie zaznaczono odchyłań standardowych. Czyżby ich nie było? Na stronie 117 podany tytuł rozdziału jest nieprecyzyjny – kał nie jest „odcinkiem przewodu pokarmowego”, tak więc powinien być również wpisany w tytuł.

Analiza wyników własnych (szkoda, że nie w kontekście zamieszczonej dalej dyskusji tych wyników) skłoniła Doktorantkę do wyciągnięcia kilku wniosków (po 4 do każdego eksperymentu). Trzy pierwsze wnioski wynikające z analizy doświadczenia I są ;prawidłowe, czwarty natomiast jest raczej spostrzeżeniem i powinien być przeredagowany. Podobnie – dwa pierwsze wnioski dotyczące eksperymentu II są obserwacjami i również powinny mieć zmienioną formę, natomiast do wniosku 3 i 4 nie mam zastrzeżeń.

### Dyskusja wyników

Dyskusja wyników napisana jest ciekawie, chociaż niestety w znacznie mierze „zastępuje” przegląd piśmiennictwa, a wyniki badań własnych są w niej porównywane i dyskutowane z wynikami innych badaczy w ograniczonym stopniu. Wiele treści zawartych w tym rozdziale, szczególnie dotyczących hiperoksalurii i kamicy nerkowej, powinno znaleźć się raczej w rozdziale zatytułowanym przez Doktorantkę „Wstęp”. Znacznie lepiej jest napisana część dyskusji poświęcona działaniu dekarboksylazy szczawianowej i innym czynnikom redukującym złogi szczawianowe w nerkach. To czego mi bardzo brakuje w dyskusji i czego oczekiwałabym w tym fragmencie rozprawy, to ustosunkowanie się krytyczne do dwóch modeli hiperoksalurii, powstałych z wykorzystaniem szczurów i świń.

Jeden i drugi model ma swoje plusy i minusy, a z punktu widzenia praktycznego ten pierwszy ma zasadniczą przewagę, a mianowicie ekonomiczną. Warto więc zastanowić się, w aspekcie dalszych badań nad potencjalnymi czynnikami, szczególnie żywieniowymi, zmniejszającymi lub redukującymi ten stan chorobowy, jaki model powinien być wybrany. Może jednak „szczurzy” – tańszy i łatwiejszy w obsłudze, wcale nie jest gorszy.

### **Ocena końcowa rozprawy**

Wszystkie uwagi poczynione przeze mnie powyżej, niejednokrotnie na pewno dyskusyjne, w zasadniczy sposób nie umniejszają wartości merytorycznej, poznawczej, a przede wszystkim użytecznej recenzowanej rozprawy. Z uznaniem należy się odnieść do niezwykle starannego opracowania redakcyjnego pracy, w której niewiele można znaleźć pomyłek literowych. Pracę czyta się bardzo dobrze, z uznaniem należy się też podkreślić szeroki zakres metodyczny pracy i staranne opracowanie wyników, co jest, jak już wcześniej zaznaczyłam, najmocniejszą stroną recenzowanej pracy. Z uznaniem należy też podkreślić przygotowanie i przeprowadzenie badania biologicznego z udziałem dużej grupy nietypowych zwierząt eksperymentalnych, jakim są świnię.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Świeboby pt.: „Model zwierzęcy hiperoksalurii indukowanej zwiększoną podażą hydroksyproliny w diecie” spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Świeboby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Joanna Gromadzka-Ostrowska