

dr hab. n. med. Magdalena Sobieska
Katedra Rehabilitacji i Fizjoterapii
WNoZ, Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, dnia 25. stycznia 2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Łukasza Puchały, przygotowanej w Katedrze Fizjologii i Rozrodu Zwierząt, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego, przedstawionej na Wydziale Medycznym Uniwersytetu Rzeszowskiego, zatytułowanej:

**Lokalizacja i kodowanie chemiczne neureguliny-1 w neuronach
śródcieniowych jelita cienkiego w modelu zwierzęcym**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy oceny przydatności wykorzystania modelu jelita cienkiego świni domowej w badaniach nad dystrybucją neureguliny-1 w neuronach jelitowego układu nerwowego, potencjalnie pod kątem stworzenia dogodnego modelu badań roli tego białka również w ludzkim przewodzie pokarmowym.

Rozprawa ma typowy układ, stosowany w pracach naukowych z dziedziny medycyny i nauk pokrewnych. Liczy łącznie 54 strony, z czego podstawy teoretyczne zamykają się na 19 stronach, opis metodyki pracy zajmuje 5 stron, szczegółowy opis wyników badań liczy 12 stron, wreszcie dyskusja wraz z wnioskami zawiera się na 9 stronach. Uzupełnieniem tekstu rozprawy jest 6 tabel, 4 wykresy i 4 ryciny, których spis zamieszczono na stronach 55-56, lecz tych stron w dostarczonym egzemplarzu brak. Dysertacja opiera się na 92 pozycjach literatury.

Rozprawa stawia następujące cele badań: cel główny - Określenie dystrybucji neureguliny-1 w neuronach jelitowego układu nerwowego jelita cienkiego świni domowej, oraz neurochemiczna charakterystyka komórek nerwowych wykazujących obecność neureguliny-1.

Jako cele szczegółowe wskazano określenie dystrybucji neuronów immunoreaktywnych wobec neureguliny-1 w poszczególnych odcinkach jelita cienkiego; zbadanie dystrybucji tychże neuronów na terenie poszczególnych typów splotów

śródsściennych jelitowego układu nerwowego i określenie neurochemicznej charakterystyki populacji jelitowych komórek nerwowych immunoreaktywnych wobec neureguliny-1.

Na podstawie wyników wykonanych badań Autor przedstawił następujące wnioski: przydatność proponowanego modelu jelita cienkiego świni domowej, ze względu na zgodność wyników badań własnych z przedstawionymi w literaturze badań modeli zwierzęcych, a także człowieka; kolokalizację neureguliny-1 i wazoaktywnego peptydu jelitowego, odwrotną zależność kolokalizacji neureguliny-1 i galaniny, a także brak zależności pomiędzy lokalizacją neuronów dodatnich pod względem neureguliny-1 i syntazy tlenu azotu.

Pracę uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim.

Opis wyników powtarza dane zamieszczone i w tabeli, i na wykresach, w ten sposób te same dane przedstawione są trzy razy... Ocenę wyników utrudnia nieco fakt, że zamieszczone w pracy wykresy mają za każdym razem inną skalę, dopiero porównanie wartości bezwzględnych w tabelach pozwala dostrzec, że najwięcej było komórek dodatnich pod względem neureguliny-1 i wazoaktywnego peptydu jelitowego, a pozostałych badanych podwójnie się barwiących mniej i porównywalnie.

Co jednak bardziej zastanawia, odsetki komórek odpowiednio VIP+, GAL+ i nNOS+ WŚRÓD komórek NEU+ mają zupełnie inny rozkład, niż ten prezentowany dla samych komórek NEU+, zarówno jeśli chodzi o poszczególne odcinki jelita cienkiego, jak i o poszczególne rodzaje splotów NEU+. Można to wyjaśnić inną dystrybucją VIP, GAL i nNOS w splotach nerwowych jelita cienkiego świni domowej, ale tym bardziej trzeba by się odnieść do tego zagadnienia w dyskusji. Jeżeli dystrybucja tamtych markerów jest znana, dlaczego Autor nie przyjął raczej ich lokalizacji za wyjściową, i nie odniósł do nich odsetka badanych komórek NEU+?

W dyskusji Autor przedstawia argumenty za tym, że zastosowany model wykazuje podobieństwa do opisywanego w literaturze modelu ludzkiego. Byłoby to niewątpliwie bardzo przydatnym praktycznym aspektem pracy.

Nie przedstawia natomiast Autor danych o ogólnej gęstości splotów nerwowych w poszczególnych odcinkach jelita cienkiego świni. Znajomość tej wielkości pozwoliłaby ocenić, czy neuregulina-1 występuje powszechnie we wszystkich rodzajach splotów, i we wszystkich odcinkach jelita cienkiego, czy też jej dystrybucja jest w jakiś sposób wybiórcza lub ograniczona.

Wreszcie, nie ma danych o dystrybucji badanych markerów (VIP, GAL i nNOS) w różnych rodzajach splotów poszczególnych odcinków jelita cienkiego świni domowej. Ta wielkość również pozwoliłaby wnioskować o powszechności kolokalizacji neureguliny-1 i badanych markerów.

Na ostateczną pozytywną ocenę rozprawy mgr farm. Łukasza Puchały składa się uznanie nowatorskiego charakteru badań, staranne opracowanie wyników i uporządkowany sposób ich prezentacji, a także dyskusja, oparta na współczesnych danych z piśmiennictwa.

Istnieją jednak pewne mankamenty, na które z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę:

1. Pierwsza uwaga dotyczy liczebności badanych próbek. Ze względu na dobrostan zwierząt Autor zdecydował się na poddanie eutanazji pięciu osobników, rozumiem jednak, że pobrał od każdego zwierzęcia kilka preparatów z każdego odcinka jelita, uwzględnionego w badaniach; ostatecznej jednak liczby próbek nie podano.

2. Druga uwaga o charakterze raczej redakcyjnym dotyczy używania skrótów w streszczeniu, co utrudnia szybkie zapoznanie się z treścią pracy, i pojawiających się błędów literowych, np. na stronie 16 -ostatni akapit - choroba Hirschsprunga, które to mankamenty należy usunąć przy przygotowaniu pracy do publikacji. Nietypowy jest też sposób cytowania literatury w tekście, z użyciem osobnego nawiasu dla każdej pozycji. Nleco to utrudnia wyszukiwanie, ale stanowi raczej uwagę edytorską, nie wpływającą na ocenę merytoryczną.

3. Trzecia uwaga dotyczy sposobu sformułowania wniosków, z których pierwszy jest właściwie streszczeniem, a ostatni sugestią co do dalszych kierunków badań. Właściwymi wnioskami z badań własnych są te o numerach 2, 3 i 4.

4. Ostatnia wreszcie uwaga dotyczy analizy statystycznej: Autor używa jedynie średniej i jej błędu standardowego. Brak informacji o badaniu normalności rozkładu wyników, a tylko pod takim warunkiem można używać średniej, poza tym powinna ona być uzupełniona miarą rozrzutu - np. odchyleniem standardowym. Ponadto, jako że badanie ma charakter nowatorski, należałoby podać zakres rozrzutu wartości badanych, co pozwoliłoby się czytelnikowi lepiej zapoznać z występowaniem badanego białka. Wreszcie, mimo że na stronie 24 podano, że znamienność różnic

badano testem t-Studenta, nigdzie przy wynikach (tabelach ani rycinach) nie pojawia się informacja, czy różnice były znamienne, czy nie. Niektóre różnice są opisane w tekście, ale nie wszystkie.

Niemniej uważam, że Autor przeprowadził całe postępowanie badawcze poprawnie, szczegółowo zinterpretował wyniki badań i że wyciągnięte z badań wnioski zgadzają się z postanowionymi w rozprawie celami, a szerokie omówienie wniosków wyciąganych z podobnych badań przez innych autorów usprawiedliwia postawione w dyskusji tezy.

Na koniec chciałabym prosić Autora o ustosunkowanie się do następujących pytań:

a) Czy odnotowano różnice pomiędzy odsetkiem komórek wykazujących ekspresję neureguliny-1 pomiędzy poszczególnymi rodzajami splotów w tym samym odcinku jelita, oraz w takim samym rodzaju splotów, ale pomiędzy poszczególnymi odcinkami jelita (np na ryc. 1 różnica dotycząca dwunastnicy i jelita biodrowego wydaje się duża)?

b) skąd decyzja, żeby badać odsetek komórek odpowiednio: VIP+, GAL+ i nNOS+ WŚRÓD komórek NEU+? Możliwe było inne podejście, czyli odsetek komórek NEU+ wśród dodatnich dla znanych już markerów, odnosząc zatem to, co nowe, do tego, co już znane. Proszę wskazać powód takiego wyboru.

Reasumując - Dysertacja spełnia kryteria rozprawy na stopień doktora nauk o zdrowiu. Na podstawie dokonanej powyższej, pozytywnej oceny, zwracam się do Rady Wydziału Medycznego Uniwersytetu Rzeszowskiego z wnioskiem o dopuszczenie magistra farmacji Łukasza Puchały do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.



dr hab. n. med. Magdalena Sobieska