

Prof. dr hab. Jacek Skomiał  
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt  
im. Jana Kielanowskiego PAN  
w Jabłonie

## O c e n a

### rozprawy doktorskiej mgr Kateryny Goncharovej pt: „The physiological role of the exocrine pancreas and the brain structure and function in studies on pig model”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem dotyczącym wykorzystania nowourodzonych prosiąt z niewydolnością zewnątrzwydzielniczą trzustki (NZT) jako modelu dla noworodków z podobną niewydolnością. Model taki pozwoliłby na określenie znaczenia siary, a szczególnie zawartych w niej immunoglobulin oraz następstw podawania enzymów trzustkowych lub typu trzustkowego w sytuacji żywienia dietą nisko- i wysokotłuszczową. Wyniki badań, uzyskane przy użyciu takiego modelu, umożliwiłyby również opracowanie nowych receptur preparatów mlekozastępczych tak, aby mogły w jak największym stopniu odzwierciedlać skład naturalnego pokarmu, jakim jest siara i mleko matki.

Niewydolność zewnątrzwydzielnicza trzustki może również występować u ludzi starszych. Opracowanie modelu nowourodzonych prosiąt z NZT umożliwiłoby więc symulację warunków występujących u tych osób. Ponadto, pozwoliłoby określić wpływ terapii, polegającej na podawaniu enzymów trzustkowych lub typu trzustkowego, na stan zdrowia oraz rolę trzustki w wywoływaniu zmian neurologicznych w mózgu, jak również możliwość ich modyfikacji.

Podstawą do ubiegania się o dopuszczenie do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych, stanowi, przedłożone przez Autorkę opracowanie, zawierające omówienie 4 oryginalnych prac naukowych oraz ich kserokopie. Praca nr 5 ma charakter przeglądowy. W trzech, z wymienionych poniżej prac, doktorantka jest pierwszym autorem (prace 2, 4 i 5), w jednej piątym (1), a w jednej piętnastym (3).

1. Pierzynowski S., Ushakova G., Kovalenko T., Osadchenko I., Goncharova K., Gustavsson P., Prykhodko O., Woliński J., Słupecka M., Ochniewicz P., Westrom B., Skibo G. 2014. Impact of colostrum and plasma immunoglobulin intake on hippocampus structure

during early postnatal development in pigs. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 35, June, 64-71,

2. Goncharova K., Pierzynowski S.G., Grujic D., Kirko S., Szwiec K., Wang J., Kovalenko T., Osadchenko I., Ushakova G., Shmigiel H., Fedkiv O., Majda B., Prykhodko O. 2014. A piglet with surgically induced endocrine pancreatic insufficiency as an animal model of newborns to study fat digestion. *British Journal of Nutrition*, 112 (12), 20160-2067,

3. Pierzynowski S., Swieboda P., Filip R., Szwiec K., Valverde Piedra J.L., Grujic D., Prykhodko O., Fedkiv O., Kruszewska D., Botermans J., Svendsen J., Skibo G., Kovalenko T., Osadchenko I., Goncharova K., Ushakova G., Westrom B. 2012. Behavioral changes in response to feeding pancreatic-like enzymes to exocrine pancreatic insufficiency pigs. *Journal of Animal Science*, 90, Suppl. 4, 439-441,

4. Goncharova K., Ushakova G., Kovalenko T., Osadchenko I., Skibo G., Pierzynowski S.G. 2015. Diet supplemented with pancreatic-like enzymes of microbial origin restores the hippocampal neuronal plasticity and behaviour in young pigs with experimental exocrine pancreatic insufficiency. *Journal of Functional Foods*, 14, 270-277,

5. Goncharova K., Pieszka M., Filip R., Pierzynowski S.G. 2015. Exocrine pancreas-brain axis – studies on pig models. *Postępy Nauk Medycznych*, 28, 5, 347-350.

Wszystkie prace, znajdujące się w opracowaniu, są wieloautorskie (od 4 do 17 autorów), a tylko w jednej pracy współautorem jest promotor rozprawy doktorskiej mgr Kateryny Goncharovej, dr hab. Marek Pieszka prof. nadzw. IZ-PIB w Krakowie. Powstaje pytanie: jaki wpływ miał Promotor na podjęcie tematyki i realizację badań? Sumaryczny IF przedłożonych prac wynosi 11,715 (2,580+3,453+2,108+3,574+0), a liczba punktów ministerialnych (wg listy na rok publikacji) – 162 (25+35+50+45+7).

Indywidualny wkład pracy doktorantki w poszczególne publikacje, potwierdzony oświadczeniami współautorów, wynosi, dla poszczególnych prac, od 5% (praca 3) do 85% (praca 5).

Praca doktorska przygotowana została w języku angielskim z obszernym streszczeniem w języku polskim. Łącznie liczy 35 stron i zawiera następujące rozdziały: Wykaz prac załączonych do rozprawy (Papers included in the thesis), Skróty (Abbreviations), Streszczenie (Summary), Wstęp (Introduction), Cele (Aims), Wyniki i dyskusja (Results and Discussion), dotyczące kolejno Publikacji I, II, III i IV, Wnioski (Conclusions), Bibliografię (References), Streszczenie w j. polskim, a następnie kserokopie publikacji I-V oraz oświadczenia współautorów (Co-authors statement).



Zarówno tekst angielski jak i polskie streszczenie zostały przygotowane poprawnie pod względem językowym.

Prace oryginalne, składające się na rozprawę doktorską, zostały opublikowane w renomowanych czasopismach. Opinia na temat ich wartości merytorycznej może więc ograniczyć się jedynie do wyrażenia poglądu, że stanowią one dobrą podstawę naukową dla przygotowanej rozprawy doktorskiej. Prace II-IV wzajemnie się uzupełniają i stanowią zwartą analizę możliwości wykorzystania prosiąt z niewydolnością zewnątrzwydzielniczą trzustki i zapobiegania lub opóźniania jej następstw, przez stosowanie dodatku enzymów trawiennych, jako modelu dla noworodków ludzkich, u których wystąpiła taka niewydolność. Badania pozwoliły jednocześnie na określenie wpływu immunoglobulin zawartych w siarze oraz znaczenia wielonienasyconych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych na strukturę i pracę ośrodkowego układu nerwowego u prosiąt z niewydolnością zewnątrzwydzielniczą trzustki, wywołaną chirurgicznie.

Niewydolność zewnątrzwydzielnicza trzustki to nieobecność lub niski poziom enzymów trzustkowych, który występuje naturalnie u noworodków oraz starszych zwierząt, jako następstwo procesu starzenia. W obu przypadkach stosowana może być terapia, uwzględniająca podawanie enzymów trzustkowych lub typu trzustkowego, pochodzenia mikrobiologicznego. W związku z tym, celem badań było wykazanie wpływu obecności aktywnych enzymów trzustkowych lub typu trzustkowego na morfologię i pracę mózgu, ocenianą na podstawie behawioru zwierząt.

Jak wynika z dotychczasowych badań, świnie z chirurgicznie wywołanym NZT, są czułym modelem, pozwalającym określić wpływ obecności enzymów trzustkowych w jelicie na pracę mózgu. Model ten wydaje się być również obiecującym narzędziem do badania mechanizmów, leżących u podstaw trzustko-zależnych zmian w ośrodkowym układzie nerwowym i możliwości ich korekcji (neurological alterations and their correction).

Głównym celem badań, prezentowanych w niniejszej rozprawie było wykazanie obecności osi mózgowo-trzustkowej. W związku z tym, konieczne było okresowe spowodowanie nieobecności enzymów trzustkowych w świetle przewodu pokarmowego. Na takim modelu badano wpływ terapii zastępczej, z zastosowaniem enzymów trzustkowych lub typu trzustkowego, pochodzenia mikrobiologicznego, na strukturę i pracę mózgu.

Autorka rozprawy przedstawiła także cele szczegółowe, a wśród nich:

- ocenę roli IgG w rozwoju hipokampu u noworodzonych prosiąt, u których występuje fizjologiczna NZT i brak IgG – wszystkie immunoglobuliny G, obecne we krwi noworodków, pochodzą z siary, a wchłaniane są ze światła jelita przed zamknięciem bariery jelitowej,

- dostosowanie i zweryfikowanie modelu NZT u prosiąt, w celu uwidocznienia roli egzogennej lipazy w trawieniu tłuszczu i wchłanianiu kwasów dokozaheksaenowego (DHA) i arachidonowego (ARA) – ważnych komponentów dla rozwoju mózgu,
- określenie roli enzymów trzustkowych obecnych w jelicie w regulacji zachowań świni,
- ocena wpływu diety z wysoką zawartością tłuszczu i enzymami typu trzustkowego pochodzenia mikrobiologicznego, na behavior oraz strukturę histo-morfologiczną hipokampu
- wykazanie wpływu pasz o różnym składzie na zachowanie zwierząt.

Dla osiągnięcia powyższych celów wykonano 4 doświadczenia, łącznie na 99 prosiątach.

Celem doświadczenia I, wykonanego na 63 prosiątach z 6 miotów, podzielonych na 5 grup doświadczalnych, było określenie wpływu siary i jednego z jej najważniejszych komponentów, jakim są immunoglobuliny, na rozwój hipokampu u nowourodzonych prosiąt. Wykazano pozytywny wpływ podawania siary i diety z dodatkiem immunoglobulin (przed zamknięciem bariery jelitowej) na rozwój struktury hipokampu, przez stymulowanie syntezy białek mózgu i jego rozwój we wczesnym okresie poporodowym. Z badań tych wynika, że immunoglobuliny wpływają na mikroglijogenezę i migrację neuronów w obszarze CA1 hipokampu.

Na podkreślenie zasługuje obserwacja, z której wynika, że zmiany w zachowaniu (apatia) prosiąt pozbawionych siary, a przez to immunoglobulin wynikać mogą ze spowolnionego rozwoju mózgu a nie koniecznie być następstwem infekcji.

*Analizując wyniki pracy powstaje jednak pytanie czy to nie stres, wynikający z nieprawidłowego żywienia, mógł być przyczyną apatii i zmian neurologicznych. Prawdopodobne jest to, że kortyzol lub inne hormony stresu wpłynęły na mózg a nie sygnały z trzustki. Inną przyczyną mógł być zbyt niski poziom glukozy we krwi, która jest głównym źródłem energii dla komórek nerwowych. Brak siary i peptydów w niej zawartych mogły spowodować zaburzenia w rozwoju jelita i trzustki, a przez to zmniejszyć strawność laktozy i innych cukrów, będących źródłem glukozy.*

W wielu przypadkach, karmienie nowonarodzonych dzieci opiera się na preparatach mlekozastępczych, gdyż często, ze względów zdrowotnych lub socjalnych, nie ma możliwości karmienia dziecka piersią. Z tego powodu, wykonano drugie doświadczenie, którego celem było określenie wpływu dodatku egzogennej lipazy do preparatów mlekozastępczych dla noworodków, na trawienie i wchłanianie tłuszczu, ze szczególnym uwzględnieniem długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.



Doświadczenie przeprowadzono na 13 siedmiotygodniowych prosiątach, z chirurgicznie spowodowaną niewydolnością zewnątrzwydzielniczą trzustki, podzielonych na 3 grupy: kontrolną i dwie doświadczalne, z których jedna otrzymywała lipazę bakteryjną a druga lipazę syntetyzowaną przez grzyby. Wykazano, czego można było oczekiwać, zależność pomiędzy dodatkiem lipazy a absorpcją tłuszczu, na którą wskazywały zarówno mniejsza ilość kwasów tłuszczowych w kale, jak i wskaźniki lipidowe krwi. Jednocześnie zaobserwowano bardzo niewielki przyrost masy ciała u prosiąt z NZT, co można tłumaczyć brakiem trzustkowych enzymów proteolitycznych oraz amylazy.

Opracowany przez Autorów model, może posłużyć jako właściwe narzędzie pozwalające na badanie wpływu składu preparatów mlekozastępczych, uzupełnianych egzogenną lipazą, a prawdopodobnie również innymi enzymami, co wymaga dalszych badań. Zdaniem autorów, model prosiąt z NZT mógłby pomóc w uzyskaniu odpowiedzi na pytania dotyczące ilości i źródła lipazy, które w największym stopniu będą wpływały na trawienie tłuszczu. Model ten mógłby również posłużyć do określenia roli wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w rozwoju jelita cienkiego, a dzięki temu do dokładniejszego poznania znaczenia karmienia piersią w tych procesach. Jest to niezmiernie ważne z punktu widzenia noworodków, które, z różnych przyczyn, taki sposób karmienia miały przedwcześnie przerwany.

Doświadczenie III jest kontynuacją badań podjętych w doświadczeniu poprzednim. Prosiąta z NZT otrzymywały dodatek enzymów typu-trzustkowego (proteaza, lipaza i amylaza) pochodzenia mikrobiologicznego. Celem tych badań była ocena wpływu dodatku tych enzymów na zachowanie prosiąt. Wykazano, że stosowanie dodatku enzymów, nie tylko poprawiło przyrosty zwierząt, ale również zwiększyło ich aktywność. Zmiany w zachowaniu mogą wskazywać na odmienną, od ogólnie przyjętej, teorię, zgodnie z którą procesy trawienia i wchłaniania składników odżywczych, prowadzące do uczucia sytości, zmniejszają aktywność ruchową ludzi i zwierząt. Wniosek ten wydaje się być bardzo ważny dla dalszych badań związanych z behawiorem zwierząt. *Chociaż należałoby rozważyć czy, różnice w zachowaniu zwierząt mogły wynikać z poprawy ogólnego dobrostanu, poprawy procesów trawiennych, zmniejszonego poziomu stresu lub zwiększonego poziomu glukozy jako „paliwa” dla mózgu.*

W doświadczeniu IV, przeprowadzonym na 15 wieprzkach, podzielonych na 3 grupy doświadczalne, badano wpływ dodatku wieloenzymatycznego preparatu pochodzenia mikrobiologicznego (jak w doświadczeniu III) do diety wysokotłuszczowej (18% tłuszczu), na aktywność ruchową i strukturę histo-morfologiczną hipokampu u prosiąt z NZT. Uzyskane

wyniki pozwalają na stwierdzenie, że NZT u prosiąt prowadzi do zmian w zachowaniu zwierząt (zwiększenie aktywności), wywołując zmiany neurodegeneracyjne w hipokampie. Ważnym osiągnięciem, wynikającym z tych badań, jest stwierdzenie, że żywność funkcjonalna – w prezentowanych badaniach jest to żywność wzbogacona w koktajl enzymatyczny – przywraca, w okresie 10 dni, zachowanie do aktywności obserwowanej u zwierząt nieoperowanych. Zdaniem autorów, stosowanie mieszaniny enzymów typu trzustkowego, pochodzenia mikrobiologicznego, może zapobiegać lub spowalniać zmiany neurodegeneracyjne, związane z niewydolnością zewnątrzwydzielniczą trzustki u prosiąt. Na uwagę zasługuje również porównanie oddziaływania diet o znacząco zróżnicowanej zawartości tłuszczu (3 vs. 18%), uzupełnianych mieszaniną enzymów typu trzustkowego. Podawanie wysokotłuszczowej diety z dodatkiem enzymów, prosiątom z NZT, zmniejszyło zakres zachowań patologicznych do poziomu obserwowanego u zwierząt z nienaruszoną trzustką.

*Wydaje się, że dokładniejszego wyjaśnienia wymaga rozbieżność wyników uzyskanych w doświadczeniach III i IV. W doświadczeniu III prosięta z NZT były mniej aktywne, a dzięki dodatkowi enzymów ich aktywność wzrosła. W opisie doświadczenia IV jest natomiast mowa o tym, że NZT zwiększa aktywność, a dodany preparat enzymatyczny ją zmniejsza. Wydaje się, że bardziej "naturalnym zjawiskiem" jest to, że prosięta z NZT są mniej aktywne od zdrowych prosiąt.*

Ostatnia z dołączonych publikacji stanowi przegląd literatury, którego celem było podsumowanie dotychczasowych badań, wskazujących na wpływ obecności aktywnych enzymów trzustkowych lub typu trzustkowego w jelicie, na morfologię i pracę mózgu. Przygotowanie takiej publikacji było zapewne bardzo pomocne w opracowaniu rozprawy doktorskiej, a szczególnie części wprowadzających do poszczególnych doświadczeń, jak również dyskusji uzyskanych wyników.

Doktorantka, wraz ze współautorami, w przedstawionej rozprawie wykazała m.in.:

- możliwość zastosowania prosiąt z NZT jako modelu do oceny preparatów mlekozastępczych dla noworodków; wymaga to jednak dalszych badań,
- znaczenie braku aktywnych enzymów trzustkowych we wchłanianiu makromolekuł, co jest szczególnie ważne dla wchłaniania immunoglobulin z siary, i potwierdza dotychczasową wiedzę,
- wpływ dodatku lipazy na uwalnianie wielonienasyconych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych i ich znaczenie dla organizmu we wczesnej fazie rozwoju, chociaż wymaga to dalszych, pogłębionych badań,



- znaczenie dodatku preparatu wieloenzymatycznego dla wzrostu i zachowania prosiąt,  
- możliwość oddziaływania na zachowanie zwierząt przez modyfikowanie składu diety; obecność odpowiedniej ilości tłuszczu wydaje się być szczególnie ważna dla rozwoju mózgu i zmniejszenia poziomu stresu u prosiąt.

Na podstawie uzyskanych, w poszczególnych pracach, wyników, szczególnie w pracy 2 i 4, można stwierdzić, że oceniana rozprawa doktorska stanowi wystarczającą podstawę do wyjaśnienia zmian w strukturach mózgu, a przez to w zachowaniu zwierząt, powodowanych przez nieobecność enzymów trzustkowych oraz modyfikację diety we wczesnym okresie pourodzeniowym. Wyniki uzyskane przy użyciu modelu prosiąt z niewydolnością zewnątrzwydzielniczą trzustki mogą być ważne dla noworodków, u których stwierdzono występowanie podobnego zjawiska, a także w leczeniu niewydolności spontanicznej, występującej w podeszłym wieku.

Z obowiązku recenzenta, muszę zwrócić uwagę na kilka uchybień, które znalazły się w opracowaniu Doktorantki.

1. W tytule rozprawy nie ma mowy o osi trzustka-mózg i nie wynika z niego, że autorka badała tego typu zależność, a sformułowanie takie znajduje się w celu badań (str. 7).
2. Stwierdzam niespójność wersji angielskiej i polskiej. Nawet, jeśli wersja polska jest tylko streszczeniem, to pominięcie jednego z celów, a w dalszym opisie także pracy nr 5, nie powinno mieć miejsca.
3. Wydaje się, że Doktorantka nie w pełni wykorzystała materiał z poszczególnych prac do przedstawienia uzyskanych wyników, a w opisie doświadczenia IV wystąpiły nieścisłości; w pracy oryginalnej mowa jest o 15 prosiątach – wieprzkach, a Autorka pisze o 12 knurkach.
4. Wnioski końcowe mają częściowo charakter dyskusji, co może utrudniać zapoznanie się z najważniejszymi osiągnięciami Doktorantki.

W dwóch pracach dołączonych do rozprawy udział Doktorantki jest niewielki (10% – publikacja 1. i 5% - publikacja 3.), a praca 1. odbiega tematycznie od pozostałych. Biorąc jednak pod uwagę, znaczenie wyników badań zaprezentowanych w pracy 2 i 4 (udział Doktorantki wynosił po 60%), ich nowatorstwo oraz rangę czasopism, w których zostały opublikowane, jak również całkowitą liczbę dołączonych prac (pięć), uważam że stanowią one wystarczającą podstawę do przygotowanej rozprawy.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Kateryny Goncharovej pt.: „The physiological role of the exocrine pancreas and the brain structure and function in studies on pig model” spełnia wymagania, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595), z późn. zm. (Dz.U. Nr 164 poz. 1365 z 2005 r. oraz Dz.U. Nr 84 poz. 455 z 2011 r.), stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki-Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach o dopuszczenie mgr Kateryny Goncharovej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jabłonna, 25.01. 2016 r.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'S. Głowacki', is written on the right side of the page.