

prof. dr hab. Stanisław Okrasa,
Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii, UWM
10-718 OLSZTYN
ul. Oczapowskiego 1A

Olsztyn 8.04.2009 r.

**Ocena pracy doktorskiej mgr. inż. Andrzeja Hermana
pt.: "Wpływ stresu immunologicznego i inerleukiny-1 β na układ podwzgórzowo-
przysadkowo-gonadotropowy u anestralnych owiec"**

CHARAKTERYSTYKA PRACY

Przedstawiona do oceny praca jest obszernym opracowaniem, obejmującym 175 stron maszynopisu, 98 rycin i 33 tabele oraz 348 pozycji piśmiennictwa. Praca zawiera typowe dla rozprawy doktorskiej rozdziały, opracowane z zachowaniem właściwych wzajemnych proporcji i generalnie jest napisana bardzo starannie, przystępnym i poprawnym językiem. Pracę rozpoczyna krótki wstęp, który poprzedza część teoretyczną. Następnie przedstawiono hipotezę badawczą oraz cel naukowy pracy. W kolejnych rozdziałach przedstawiono stosowane materiały i metody badawcze, uzyskane wyniki oraz dyskusję im poświęconą. Po czym dokonano krótkiego podsumowania wyników, przedstawiono wnioski i spis literatury. Praca zawiera także objaśnienia skrótów, spisy rysunków i tabel oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Szereg badań potwierdziło występowanie wielu interakcji pomiędzy układem nerwowym, hormonalnym i odpornościowym. Podstawą tych interakcji jest występowanie receptorów w każdym z tych układów, wykazujących powinowactwo do tych samych ligandów, które – oprócz wcześniej przypisanego im głównego miejsca wytwarzania (układu) – mogą także powstawać w innych strukturach (układach) organizmu. Powstało, dosyć często używane obecnie, pojęcie „triady regulacyjnej” odnoszące się do współdziałania wymienionych układów w regulacji procesów fizjologicznych. O ile badania dotyczące współdziałania układu nerwowego i hormonalnego mają dłuższą historię, to badania uwzględniające także rolę układu odpornościowego w procesach regulacyjnych zaczęto rozwijać głównie w okresie ostatnich 20 lat.

Temat pracy doktorskiej mgr. inż. Andrzeja Hermana jest bardzo aktualny, a badania w niej przedstawione dotyczą oddziaływania systemu odpornościowego na układ podwzgórzowo-przysadkowo-gonadotropowy u anestralnych owiec. Zakres podjętych przez Doktoranta badań jest bardzo szeroki, a ich wykonanie wymagało zastosowania wielu różnorodnych technik badawczych.

Opisane w pracy doświadczenia obejmują:

- zbadanie wpływu obwodowego podania endotoksyny bakteryjnej (LPS) – stanowiącej stres immunologiczny – i centralnego podania IL-1 β na:
 - koncentracje prolaktyny i kortyzolu (wskaźniki stresu) oraz LH i FSH w osoczu;
 - ekspresję genu GnRH i receptora GnRH w wybranych strukturach przodomózgowia oraz genu receptora GnRH w gruczołowej części przysadki;

- ekspresję genów dla prolaktyny i podjednostek β LH i FSH oraz receptorów tych hormonów w przysadce;
 - ekspresję genu IL-1 β i receptorów cytokin (IL-1 β , TNF α , IL-6) oraz receptora lipopolosacharydu – TLR4 w podwzgórzcu i/lub przysadce;
- zbadanie zmian poziomu IL-1 β w płynie mózgowo-rdzeniowym po podaniu LPS;
- oraz wyznaczenie wpływu centralnego podania IL-1 β na translację GnRH w POA.

We *Wstępie* pracy, Autor uzasadnia celowość podjętych badań, zmierzających do wyjaśnienia wpływu stresu immunologicznego na układ podwzgórzowo-przysadkowo-gonadotropowy, który pełni kluczową rolę w regulacji procesów rozrodczych. W pracy dodatkowo podjęto próbę wyjaśnienia roli w tym oddziaływaniu IL-1 β , uznawanej za pierwszoplanową cytokinę w reakcjach odpornościowych. Badania przeprowadzono na owcach w okresie anestrus. Przyjęta hipoteza badawcza, jak i szczegółowe cele pracy są w pełni uzasadnione, pomijając pewne nieścisłości, które będą przedstawione w dalszej części recenzji. We *Wstępie* wskazane byłoby podanie uzasadnienia wyboru okresu fizjologicznego anestrus, podczas którego przeprowadzono badania na owcach. W *Części teoretycznej* pracy, omówiono strukturę i właściwości lipopolisacharydu i jego receptora (TLR4), wybranych cytokin (IL-1 β , IL-6, TNF α) i ich receptorów oraz strukturę i rolę bariery krew-mózg w komunikacji pomiędzy układem immunologicznym a ośrodkowym układem nerwowym. Przedstawiono również strukturę i rolę układu podwzgórzowo-przysadkowego w regulacji rozrodu, m.in. uwzględniając opis podwzgórza owcy i charakterystykę gonadoliberyny (GnRH) i jej receptora oraz hormonów przysadkowych uczestniczących w regulacji procesów rozrodczych (LH, FSH i prolaktyny) i ich receptorów. Zwrócono także uwagę na główne układy neuralne, które mogą wpływać na system GnRH-ergiczny, szczególnie podkreślając możliwe oddziaływania kortykoliberyny (CRH) na GnRH. Powyższe zagadnienia zostały przedstawione bardzo przystępnie z wykorzystaniem starannie opracowanych 10 ilustracji.

W rozdziale *Materiały i metody* podano podstawowe informacje o zwierzętach doświadczalnych ($n > 50$) i przedstawiono przebieg czterech doświadczeń oraz opisano stosowane metody badawcze. Na podkreślenie zasługuje znaczna liczba różnorodnych technik wykorzystanych przez Doktoranta w badaniach, m.in. takich jak: implantacja kaniul typu „push-pull” do trzeciej komory mózgu owiec, radioimmunologiczne oznaczanie hormonów (LH, FSH, prolaktyny i kortyzolu), identyfikacja IL-1 β metodą ELISA i Western Blot, oraz analiza ekspresji wielu genów (GnRH, GnRHR, LH β , LHR, FSH β , FSHR, PRL, PRLR, IL-1 β , IL-1R1, IL-1R2, IL-6R, TNF-R1, TNF-R2 i TLR4) metodą Real Time-PCR w wybranych strukturach podwzgórza (POA, AHA, MBH, ME) i/lub przysadce. W analizie ekspresji badanych genów metodą Real Time-PCR wykorzystano barwnik fluoroscencyjny SYBR® Green1, a w przypadku genu podjednostki β LH dodatkowo użyto molekularne sondy hybrydujące. Wartościowym wzbogaceniem badań jest określenie wpływu IL-1 β na translację GnRH w perikarionach obszaru przedwzrostowego przodomózgowia przez wyznaczenie gradientu rozkładu polisomów dla mRNA GnRH. Od strony formalnej, za wyczerpujące należy uznać informacje umieszczone w tej części pracy na temat stosowanych technik biologii molekularnej. Obejmują one bowiem nie tylko pełną charakterystykę starterów wykorzystanych do określania ekspresji badanych genów, sposób przygotowywania odczynników i szczegółowe warunki przeprowadzanych analiz, ale również bardzo praktyczne komentarze. Jedynie w opisie metody RIA, użytej do oznaczania gonadotropin, prolaktyny i kortyzolu, pominięto informacje o pochodzeniu przeciwciał i ich specyficzności.

Generalnie, należy stwierdzić, iż realizacja tak szeroko zakrojonych badań wymagała bardzo dużego nakładu pracy i determinacji ze strony Doktoranta.

W rozdziale *Wyniki* w sposób czytelny i staranny opisano i zilustrowano osiągnięte rezultaty wykonanych badań. Spośród uzyskanych wyników na szczególne podkreślenie zasługują:

- **zmiany po doobwodowym podaniu zwierzętom doświadczalnym LPS, takie jak:**
 - wzrost koncentracji kortyzolu i prolaktyny w osoczu, a obniżenie – LH;
 - zwiększenie mRNA receptora TLR4, IL-1 β oraz generalnie receptorów cytokin (IL-1 β , IL-6, TNF α) w badanych strukturach OUN (POA, AHA, MBH, ME), a zmniejszenie ekspresji genów GnRH i GnRHR w POA i ME;
 - znaczny wzrost koncentracji IL-1 β (ok. 11-krotny) w płynie mózgowo-rdzeniowym pobranym z III komory mózgu;
 - obniżenie ekspresji genu GnRHR, LH β i LHR, a wzrost – genów FSH β , FSHR, PRL, PRLR, IL-1R1/2, IL-6R, TNF-R1/2 i TLR4 w przedniej części przysadki;
- **zmiany po podaniu IL-1 β do III komory mózgu, takie jak:**
 - obniżenie ekspresji genu GnRH w POA i ME oraz GnRHR w ME, a wzrost ekspresji genu IL-1 β w POA, MBH i ME oraz receptora IL-1 β typu I w POA i MBH;
 - zmniejszenie intensywności translacji GnRH w POA;
 - zmniejszenie ekspresji genu GnRHR oraz podjednostek β LH i FSH w przysadce.

Za szczególnie wartościowe należy uznać wykazanie przez Doktoranta obecności mRNA dla GnRH w ME, co wskazuje na występowanie aksonalnego transportu mRNA, kodującego prekursor gonadoliberyny, oraz mRNA dla receptorów LH i FSH w przysadce, co może sugerować udział ultrakrótkiej pętli sprzężenia zwrotnego – na poziomie przysadki – w regulacji wydzielania gonadotropin. Wyróżnione wyniki otwierają możliwość głębszego poznania – w toku dalszych badań – mechanizmu funkcjonowania układ podwzgórzowo-przysadkowo-gonadotropowego u owiec. Podkreślić należy, iż stwierdzenie obecności mRNA dla GnRH w ME i mRNA dla receptorów LH i FSH w przysadce oraz wpływu centralnie podawanej IL-1 β na intensywność translacji GnRH w POA zostało dokonane przez Doktoranta po raz pierwszy u owiec. Z kolei, zastanawiający jest brak wpływu IL-1 β , podanej do III komory mózgu, na poziomy LH, prolaktyny i kortyzolu w osoczu badanych zwierząt (zmiany wystąpiły po podaniu im LPS) oraz wzrost mRNA dla FSH β w przysadce po podaniu LPS, przy równoczesnym obniżeniu ekspresji genu LH β .

W *Dyskusji* pracy, Doktorant wnikliwie i krytycznie analizuje uzyskane przez siebie wyniki, odnosząc je do danych literaturowych dotyczących rozpatrywanych zagadnień. Mimo tak dużej liczby danych, pochodzących z własnych badań, dyskusja jest bardzo uporządkowana, dzięki podzieleniu jej na części poświęcone najważniejszym problemom związanym z tematem pracy. Autor rozpatruje w niej: 1/ rolę LPS w modulacji aktywności układu rozrodczego na poziomie podwzgórza i przysadki, 2/ rolę uniwersalnych mediatorów zapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF α) w regulacji aktywności osi HPG u anestralnych owiec, 3/ obecność receptora LPS w podwzgórzcu i przysadce anestralnych owiec oraz 4/ rolę IL-1 β w modulacji aktywności układu rozrodczego na poziomie podwzgórza. W *Dyskusji* wyróżnia się fragment, dotyczący obecności mRNA dla GnRH w ME. Zdaniem Doktoranta fakt ten skłania do nowego spojrzenia na fizjologię neuronów GnRH, ale także sugeruje konieczność potwierdzenia tej obserwacji innymi metodami, np. metodą hybrydyzacji *in situ*. Doktorant poświęcił również sporo uwagi – bardzo słusznie – analizie możliwości oddziaływania LPS na procesy zachodzące w OUN, które doprowadziły do określonych zmian w badanych

strukturach przodomózgowia, przypisując kluczową rolę IL-1 β w modulowaniu aktywności neuronów GnRH (szczególnie w pierwszym okresie trwania zapalenia).

Pracę kończą poprawnie sformułowane cztery wnioski, które syntetycznie podsumowują uzyskane przez Doktoranta wyniki. Bogaty wykaz piśmiennictwa zawiera przede wszystkim pozycje z ostatniego okresu, a także ważniejsze publikacje z wcześniejszych lat. Autor umiejętnie, tzn. w sposób selektywny i krytyczny, wykorzystał informacje z nich pochodzące podczas pisania swojej pracy.

PYTANIA i UWAGI

1. Wśród szczegółowych celów pracy wymieniono (w pkt. 4) m.in. zbadanie zmian ekspresji genów dla receptora TNF α i IL-6 w strukturach podwzgórza i przysadce po centralnym podaniu IL-1 β owcom. W pracy nie przedstawiono wyników tych badań. Czy to oznacza, że IL-1 β nie wykazywała wpływu na ekspresję genów receptorów TNF α i IL-6 w badanych strukturach? W punkcie 3 celów pracy, prawdopodobnie przez pomyłkę, podano, że ekspresja genów dla prolaktyny, podjednostek β LH i FSH oraz ich receptorów będzie badana także w podwzgórzu. W rzeczywistości była ona badana tylko w przysadce, co jest w pełni zrozumiałe.
2. Metodą Western Blot stwierdzono obecność białka IL-1 β w przedniej części przysadki. Czy badano zawartość mRNA dla IL-1 β w przysadce po podaniu owcom LPS, czy też nie stwierdzono wpływu lipopolisacharydu na ekspresję genu IL-1 β w tym gruczole i w związku z tym nie zamieszczono tych wyników w pracy?
3. W przeprowadzonych badaniach wykazano wzrost koncentracji kortyzolu i prolaktyny w osoczu, a obniżenie – LH, u anestralnych owiec po doobwodowym podaniu LPS. W pracy przedstawiono wyniki w postaci średnich wartości dla okresów pobierania krwi; 2 h przed i 6 h po podaniu LPS lub soli fizjologicznej. Nasuwa się pytanie o dynamikę odpowiedzi wymienionych hormonów na LPS, tj. po jakim czasie od podania lipopolisacharydu wystąpiła określona zmiana w wydzielaniu tych hormonów?
4. Generalnie należy zachować ostrożność w wyciąganiu wniosków na temat braku zależności mierzonego efektu od dawki testowanego czynnika w przypadku stosowania w doświadczeniu tylko dwóch jego dawek. Taki przypadek miał miejsce w doświadczeniu z podawaniem IL-1 β do III komory mózgu, szczególnie w odniesieniu do zmian w ekspresji genów GnRH w POA i ME oraz IL-1 β w POA, MBH i ME. Wskazana jest weryfikacja zależności tych zmian od dawki IL-1 β z uwzględnieniem jeszcze innych dawek tej cytokiny.
5. W pracy błędnie podano angielski odpowiednik (str. 35) nazwy „wyniosłości przyśrodkowej – *median eminence*” (powinno być „*medial eminence*”).
6. W pracy występują – stosunkowo nieliczne – usterki redakcyjne, powstałe wskutek przeoczenia. Wymieniam je z obowiązku recenzenta:
 - zamiast „pozapalne” (str. 1), powinno być „prozapalne”;
 - „przez tą cytokinę”, raczej powinno być „przez tę cytokinę”;
 - „TRL4” (w wielu miejscach pracy, m.in. na str. 5), powinno być TLR4;
 - „process” (Rys. 2-2), powinno być „proces”;
 - „dalszej części niniejszej pracy”, powinno być „w dalszej części niniejszej pracy”;
 - „w przy zastosowaniu” (str. 36), powinno być „przy zastosowaniu”;

- str. 37/wiersz 4 od góry – raczej nie powinno być „n=5”;
- „FSHB” (Tab. 4-4), powinno być FSH β ;
- „żelu poliakrylamidoweg”, powinno być „żelu poliakrylamidowego”;
- „w 150 ml buforem”, powinno być „w 150 ml buforu”;
- „krew owiec (n=2) pobraną”, ze względu na kontekst powinno być „krew owiec (n=2) pobrana”;
- „okresie astralnym” (str. 114), powinno być „okresie anestrалnym”;
- „na komórkach mikrogleju” (str 124), zdanie z tym wyrażeniem wymaga odpowiedniego poprawienia;
- „ilość wzajemnych sprzężeń”, raczej powinno być „liczba wzajemnych sprzężeń”;
- „w podwzgórz u owiec wykazano” (str. 129), ze względu na kontekst powinno być „w podwzgórz u owiec wykazała”;
- wbrew powszechnie przyjętej zasadzie, w niektórych tytułach zastosowano kropkę.

Przedstawione powyżej uwagi/pytania zupełnie nie pomniejszają bardzo wysokiej merytorycznej wartości pracy a jedynie mogą być przydatne w planowaniu dalszych badań oraz podczas przygotowywania pracy do druku.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu należy stwierdzić, że niniejsza praca prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny i zawiera liczne, wartościowe wyniki badań. Charakteryzuje ją kompleksowe podejście do rozpatrywanego problemu oraz zastosowanie wielu odpowiednio dobranych metod badawczych. Z pewnością uzyskane wyniki – po opublikowaniu – wzbogacą w nowe i cenne informacje naszą dotychczasową wiedzę na temat funkcjonowania układu podwzgórzowo-przysadkowo-gonadotropowego u anestrалnych owiec.

W ocenianej pracy Doktorant wykazał się bardzo dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, pełnym zrozumieniem rozpatrywanego problemu i dobrą znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Sposób napisania pracy oraz szeroki zakres badań w niej przedstawionych, których wyniki są bardzo wartościowe pod względem poznawczym, świadczą o dojrzałości naukowej, dociekliwości i pracowitości Doktoranta.

WNIOSEK KOŃCOWY

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca zatytułowana **”Wpływ stresu immunologicznego i interleukiny-1 β na układ podwzgórzowo-przysadkowo-gonadotropowy u anestrалnych owiec”** spełnia wszystkie wymagania – określone w obowiązującej Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (z dnia 14. marca 2003 r.) – stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt *im. Jana Kielanowskiego* PAN z wnioskiem o dopuszczenie **mgr. inż. Andrzeja Hermana** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę szeroki zakres badań przeprowadzonych przez Doktoranta oraz wysoką wartość poznawczą uzyskanych wyników, sugeruję wyróżnienie tej pracy stosowną nagrodą.

Stanisław Okrasa

S Okrasa