

Prof. dr hab. Jan Udała
Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt
i Higieny Środowiska
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Bartosza Jarosława Przybyła pt. „Modulacyjne działanie neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) w regulacji osi gonadotropowej i somatotropowej na poziomie podwzgórze-przysadka u owcy” wykonanej w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem dr hab. Anny Wójcik-Gładysz, prof. instytutu i dr Michała Szlisa jako promotora pomocniczego

Utrzymanie względnej stałości środowiska wewnętrznego jest niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych organizmu, a poznanie mechanizmów je regulujących jest istotne dla zachowania zdrowia i wysokiej produktywności zwierząt. Prowadzone od kilku dekad intensywne badania i zdobyta dzięki nim wiedza z zakresu neuroendokrynologii, do czego w znaczny stopniu przyczynili się również badacze z jednostki, w której wykonana została niniejsza praca doktorska, pozwoliły na poznanie ogólnych zależności między wybranymi strukturami ośrodkowego układu nerwowego i narządami przez nie sterowanymi. Osiągnięte wyniki, poza aspektem poznawczym, mają duże znaczenie aplikacyjne i są szeroko wykorzystywane w hodowli zwierząt. Dla wielu hodowców trudno byłoby ją obecnie prowadzić i konkurować na rynku bez możliwości chociażby zastosowania preparatów hormonalnych w regulacji cyklu rujowego czy też leczeniu różnych schorzeń i zaburzeń. Na tle tych niewątpliwych osiągnięć, wiele zagadnień dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za koordynację poszczególnych procesów fizjologicznych, zwłaszcza w kontekście zachowania względnej równowagi organizmu będącej warunkiem dobrego zdrowia i wysokiej produktywności zwierząt, nie zostało wyjaśnionych. Dotyczy to między innymi problemów jakimi zajął się w pracy Doktorant, tzn. bliższego poznania roli neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego w regulacji procesów związanych z łaknieniem, rozrodem i gospodarką energetyczną. Powyższa problematyka wpisuje się w rozwijany w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt z dużym powodzeniem od kilku już dekad nurt badawczy dotyczący regulacji neurohormonalnej wzrostu i rozrodu na poziomie ośrodkowego układu nerwowego. Powszechnie znane są prace

pracowników jednostki nad rolą wybranych ośrodków centralnego układu nerwowego w regulacji procesów rozrodczych w warunkach zróżnicowanego żywienia i zmiennych warunków oświetlenia. Te pionierskie badania rozpoczęte w drugiej połowie ubiegłego wieku, realizowane są obecnie w Instytucie przez doświadczone zespoły naukowe, co podkreśla specyfikę prowadzonej przez nie działalności badawczej i wyróżnia je na tle innych jednostek w kraju i poza nim.

Wykorzystując zdobytą wiedzę i doświadczenie z minionych lat pracy badawczej, Zespół pod kierownictwem Promotor niniejszej rozprawy podjął dalsze badania nad rolą wybranych czynników w regulacji oraz koordynacji procesów rozrodczych i energetycznej równowagi organizmu na poziomie OUN. Otrzymane wyniki w przypadku jednego z tych czynników, neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego, posłużyły do przygotowania przez mgr Bartosza Jarosława Przybyła pracy doktorskiej. Składają się na nią następujące 3 publikacje:

1. **Przybył B.J.**, Szlis M., Wójcik-Gładysz A., 2020: Brain-derived neurotrophic factor affects mRNA and miRNA expression of the appetite regulating centre in the sheep arcuate nucleus. *Annals of Animal Science*, 20, 853–869, DOI: 10.2478/aoas-2020-0015
MEiN 2021 = **100 pkt**; IF 2020 = **2.090**
2. **Przybył B.J.**, Szlis M., Wójcik-Gładysz A., 2021: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) affects the activity of the gonadotrophic axis in sheep. *Hormones and Behavior*, 131, 104980, DOI: 10.1016/j.yhbeh.2021.104980
MEiN 2021 = **100 pkt**; IF 2021 = **3.587**
3. **Przybył B.J.**, Wójcik-Gładysz A., Gajewska A., Szlis M., 2021: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) affects somatotrophic axis activity in sheep. *Journal of Animal and Feed Sciences*, DOI: 10.22358/jafs/143353/2021
MEiN 2021 = **100 pkt**; IF 2021 = **1.525**

Sumaryczny Impact Factor = **7.202** Suma punktów MEiN = **300**

Jak wynika z powyższego zestawienia publikacji, we wszystkich Doktorant jest pierwszym autorem. Swoją udział w ujęciu wskaźnikowym szacuje w każdej z nich na 40%. Wskazuje to na Jego zaangażowanie w cały proces powstania i wydania publikacji. Udział ten polegał na wykonaniu doświadczeń i analiz laboratoryjnych, wykonaniu analizy statystycznej wyników i ich interpretacji oraz udziale w napisaniu. Doktorant nie uczestniczył w opracowaniu koncepcji i założeń badań ale wydaje się to zrozumiałe, mając na uwadze długofalowy charakter realizowanych prac badawczych w Zespole i ustalony zapewne wcześniej plan pracy. Pełnienie jednak znaczącej roli w procesie powstawania prac świadczy

o posiadanych zdolnościach organizacyjnych przez Doktoranta i umiejętnościach współpracy z innymi Członkami Zespołu, co jest niewątpliwie pozytywną cechą, zważywszy znaczenie wspólnie podejmowanych działań i myśli koncepcyjnej w twórczej działalności naukowej.

Przyjęta forma przygotowania dysertacji na podstawie opublikowanych już prac naukowych w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, ułatwia w znacznym stopniu wykonanie zadania postawionego przed recenzentem w zakresie merytorycznej oceny pracy. Prace te bowiem uzyskały pozytywne opinie niezależnych ekspertów związanych z daną problematyką co świadczy o ich dużej wartości naukowej. Rola oceniającego powinna więc raczej skupiać się na ocenie komplementarności i spójności prac, ich znaczenia dla rozwoju wiedzy w danej dyscyplinie oraz polemice z Autorem na temat uzyskanych wyników.

Powyższe wyniki zamieszczone w trzech publikacjach Doktorant zaprezentował w pracy przygotowanej według obowiązujących wymogów dla tego typu opracowań naukowych.

W pracy tej poza streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów stosowanych w pracy, zawarł następujące rozdziały: wstęp, hipoteza i zadania badawcze, materiał i metody, omówienie wyników cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, podsumowanie, wnioski, bibliografia. Jako załączniki zamieszczono publikacje, na podstawie których przygotowano niniejszą dysertację i oświadczenia autorów publikacji stanowiących rozprawę doktorską.

We wstępie, będącym zarazem krótkim przeglądem literatury, Autor opisuje rolę i budowę podwzgórza zaznaczając, że jest ono strukturą mózgu odpowiedzialną za koordynację sygnałów docierających z ośrodkowego układu nerwowego i tkanek obwodowych organizmu. W bardzo przystępnej formie opisowej oraz graficznej przedstawia ośrodki i sieci neuralne w trzech obszarach podwzgórza zaangażowane w regulację poszczególnych procesów jakimi zajął się w swojej pracy. Wprowadza tym samym czytelnika w obszar swoich zainteresowań, wskazując zarazem ewentualne kierunki oddziaływania neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego. Najważniejsze informacje o tym czynniku podaje w następnych podrozdziałach. W oparciu w dostępne dane w piśmiennictwie wskazuje na potwierdzony już jego udział w obszarach mózgu powiązanych z regulacją procesów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy energetycznej organizmu oraz możliwy udział w regulacji kluczowych hormonów osi gonadotropowej i neuromodulacji aktywności osi somatotropowej.

Powyższe sugestie niektórych badaczy o udziale tego czynnika we wspomnianych procesach skłoniły zapewne Zespół do podjęcia prac w tym kierunku i włączeniu do ich realizacji Doktoranta.

W przyjętych trzech hipotezach badawczych założono, że BDNF na poziomie podwzgórza uczestniczy w modulacji aktywności neurohormonalnej sieci regulującej łaknienie i ma wpływ na sekrecję hormonów podwzgórzowo-przysadkowej osi gonadotropowej i osi somatotropowej.

Postawione hipotezy są poprawnie sformułowane w kontekście dokonanego przeglądu wyników prac innych autorów, doświadczeń własnych Zespołu, z którym współpracował Doktorant oraz posiadanych możliwości wykonania badań. Dla ich potwierdzenia poprawnie wyznaczono trzy szczegółowe cele, a dla ich realizacji trzy zadania badawcze.

W materiałach i metodach, na samym początku Autor podał co było przedmiotem badań, liczbę, miejsce i warunki utrzymywania zwierząt. Na schemacie zamieścił także przebieg doświadczenia dla każdej owcy. Następnie dokładnie opisano zabieg implantacji kaniuli do III komory mózgu, prezentując końcowy jego efekt na zdjęciach rentgenowskich.

W dalszej części przedstawiono metodę Chronogest, którą zastosowano do synchronizacji rui oraz sposób przydzielenia owiec do grup badawczych i rodzaje wykonanych infuzji. Trafnym i dobrym rozwiązaniem było zamieszczenie przejrzystego schematu graficznego wykonania tych infuzji, co znacznie wzbogaca ten rozdział pracy. Nie budzą także zastrzeżeń dalsze podrozdziały, w których podano sposoby pobierania próbek do badań i ich zabezpieczenia do czasu wykonania analiz laboratoryjnych, a także zastosowane metody analityczne. Dokładny opis tych metod znajduje się w poszczególnych opublikowanych pracach. W ostatnim podrozdziale zaprezentowano wykorzystane metody analizy statystycznej.

Jak zaznaczyłem wcześniej, od strony merytorycznej, w tym doboru materiału i metod badawczych, praca była poddana już ocenie. Należy jednak podkreślić trafność doboru tych metod i wskazać na posiadane możliwości wykonania specjalistycznych badań, pozwalających na dokonanie oceny zmian badanych wskaźników po wykonanych infuzjach. Autor wykorzystał szeroki wachlarz nowoczesnych technik badawczych z zakresu biologii molekularnej, wymagających posiadania specjalistycznego sprzętu, dużej wiedzy, umiejętności manualnych i analitycznych. W badaniach nad ekspresją mRNA poszczególnych neuropeptydów wykorzystano komercyjne testy, natomiast oznaczenia stężeń hormonów LH, FSH i GH wykonano sprawdzoną i wiarygodną metodą radioimmunologiczną, od kilku już dekad stosowaną w Instytucie. Należy podkreślić, że pracownicy Instytutu mają duże zasługi w opracowaniu tej metody i wdrożeniu jej do specjalistycznej praktyki laboratoryjnej.

Na podstawie przeprowadzonych wszechstronnych badań, Autor uzyskał szereg interesujących wyników, które w zwięzłej formie zaprezentował w następnym rozdziale „Omówienie wyników cyklu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej”. Na początku tego rozdziału nadmienił, że z zaburzeniami równowagi energetycznej organizmu związanych z nieprawidłową aktywnością neurohormonów w mózgu powiązanych jest szereg chorób cywilizacyjnych. Uzasadnia tym samym potrzebę prowadzenia badań w tym kierunku. Owcę przedstawia jako zwierzę modelowe do tego typu badań, posiadającą wiele cech wspólnych pod względem anatomicznym i funkcjonalnym, mogącą stanowić podstawę dla przyszłych badań przedklinicznych w dziedzinie neuroendokrynologii.

Ten fragment rozważań Autora, zawierający niezwykle trafne spostrzeżenia i sugestie, proponowałbym raczej zamieścić we wstępie, jako wprowadzenie czytelnika w istotę problemu, jaki postanowił rozwiązać.

Otrzymane wyniki przedstawiono chronologicznie dla każdego z postawionych celów, odpowiadających trzem kolejnym opublikowanym pracom. Odnoszenie się w kolejnych pracach do wyników z wcześniejszych prac świadczy o komplementarności i spójności tematycznej dysertacji, co jest podstawowym wymogiem dla tego rodzaju opracowań naukowych. Powoływanie się także na wcześniejsze badania realizowane przez Zespół oraz wskazywanie na potrzebę ich rozszerzenia o nowe zagadnienia potwierdza długofalowy i twórczy charakter realizowanych prac w tym obszarze, wytyczanie nowych kierunków badawczych i wkład w rozwój nauki.

Wykonane badania pozwoliły w pełni potwierdzić postawione hipotezy badawcze i osiągnąć postawione cele. W przypadku pierwszej z nich u owiec otrzymujących infuzję BDNF wykazano zależny od dawki istotny wzrost ekspresji mRNA badanych neuropeptydów co potwierdza, że czynnik ten wpływa na aktywność podwzgórzowej sieci regulującej łaknienie w ARC. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że są to pierwsze tego typu badania wykonane na owcach w warunkach *in vivo*.

Ważną sugestią, a zarazem propozycją Autora, jest wykonanie w przyszłości badań, które pozwoliłyby na zbadanie zmian zachodzących na poziomie ekspresji białka co potwierdziłoby powyższe spostrzeżenia. Należy się z tym zgodzić, mając na uwadze fakt, że zmiany w ekspresji mRNA nie w pełni odzwierciedlają zmiany na poziomie ekspresji białka.

Równie interesujące okazały się wyniki otrzymane przy weryfikacji drugiej hipotezy. Stwierdzono bowiem, że BDNF oddziałuje na aktywność neuronów GnRH oraz neuronów KNDy w podwzgórzu modulując w odmienny sposób poziom gonadotropin we krwi

obwodowej, powodując obniżenie LH a wzrost FSH. Pozwoliło to na zasugerowanie Autorowi, że czynnik ten uczestniczy w modulacji funkcjonowania osi gonadotropowej na poziomie OUN u owiec.

Dla potwierdzenia trzeciej hipotezy wykonano analizy ekspresji mRNA GHRH i SRIF w podwzgórzu oraz mRNA SSTR2, SSTR5, GHRH-R i GH w przysadce mózgowej. Określono również stężenie GH w homogenatach przysadki oraz profile pulsacyjne GH we krwi obwodowej. Uzyskano różnice w wynikach między grupą kontrolną a doświadczalnymi pozwoliły na wykazanie, że BDNF wpływa na aktywność kluczowych hormonów osi somatotropowej, zarówno na poziomie podwzgórza jak i przysadki.

Bardzo trafnym rozwiązaniem było zestawienie najważniejszych wyników w formie graficznej na rycinie, wykonanej przejrzysto i dobrze ilustrującej osiągnięte efekty.

Generalnie powyższy rozdział jest poprawnie opracowany. Spośród dużej liczby danych zamieszczonych w trzech publikacjach, Autor wybrał te najważniejsze, charakteryzując je w trzech podrozdziałach odpowiadającym przyjętemu wcześniej celom i hipotezom badawczym. Krótkie reasumpcje na końcu każdego podrozdziału wynikają z głębokich przemyśleń i spostrzeżeń, dowodząc jednocześnie bardzo dobrej znajomości problematyki badawczej przez Doktoranta.

Pierwsza pozycja wśród autorów we wszystkich opublikowanych pracach składających się na dysertację doktorską, potwierdzają niewątpliwie posiadane przez Kandydata umiejętności analizy i weryfikacji oraz krytycznej oceny osiągnięć własnych na tle osiągnięć innych badaczy. Dlatego też można mieć pewien niedosyt, że na tle jasno i przejrzysto zaprezentowanych wyników, Doktorant nie przeprowadził trochę szerszej dyskusji. Zapewne wyszedł z założenia, że zrobiono to w każdej opublikowanej pracy. Prace te wzajemnie się uzupełniają, stanowią monolityczne opracowanie naukowe, dotyczą wspólnego rozwiązywanego problemu, co jest niewątpliwie zaletą i świadczy o spełnieniu warunków stawianych dla przygotowanych w tej formie prac doktorskich. Na powyższy problem składa się jednak wiele wątków dotyczących gospodarki energetycznej, wzrostu i rozrodu. Dlatego dokonanie krótkiego omówienia wyników własnych na tle dokonań innych badaczy pozwoliłoby Autorowi bardziej podkreślić istotę rozwiązywanego problemu, podjąć polemikę i przedstawić szerzej własny punkt widzenia, co w publikowanych artykułach ze względu na wymogi redakcyjne jest ograniczone lub niemożliwe.

W związku z powyższym chciałbym Autora zapytać:

1. Czy widziałby potrzebę ewentualnego włączenia hormonów steroidowych do przyszytych badań z zakresu problematyki jaką podjął w pracy doktorskiej?

2. W pracy przyjęto, że owulacja wystąpiła między 4-5 dniem po podaniu owcom PMSG, kiedy spada we krwi zawartość estrogenów. Czy nie warto było określić tego momentu na podstawie stężenia LH?

Najważniejsze rezultaty swoich badań Autor przedstawił w krótkim 5-cio punktowym podsumowaniu, a następnie wyciągnął 3 wnioski. Odpowiadają one na postawione cele badawcze i potwierdzają założone hipotezy.

Ostatni fragment w rozdziale „Wnioski” jest w zasadzie uzasadnieniem do nich. Ten fragment przeniósłbym do rozdziału „Podsumowanie”.

Jak zaznaczono wcześniej, w toku realizacji pracy Autor uzyskał wiele danych, na tym etapie, głównie o charakterze poznawczym, mogących jednak znaleźć w przyszłości zastosowania praktyczne. Na podkreślenie zasługuje:

1. Wskazanie, po raz pierwszy w badaniach in vivo, że BDNF wpływa na podwzgórzową sieć regulującą łaknienie u przeżuwaczy.
2. Wskazanie na zaangażowanie BDNF poprzez oddziaływanie na sieci neuralne ośrodków w OUN w mechanizmy regulujące aktywność gonadotropową i somatotropową osi podwzgórzowo-przysadkowej.
3. Wskazanie na wiele jeszcze ogniw w OUN o niewyjaśnionym znaczeniu w powyższych mechanizmach i potrzebie wykonania badań na poziomie ekspresji białka, co świadczy o twórczym charakterze pracy, zachęcającym do dalszych prac w tym obszarze wiedzy.

Niniejsza praca, stanowiąca podsumowanie wyników zamieszczonych w trzech oryginalnych pracach twórczych, napisana jest poprawnym językiem. Autor w przystępnej i zrozumiałej formie zaprezentował najważniejsze wyniki jakie uzyskał w trakcie wykonanych doświadczeń nad wpływem BDNF na modulację aktywności neurohormonalnej sieci regulującej łaknienie na poziomie podwzgórza oraz regulację podwzgórzowo-przysadkowej osi gonadotropowej i somatotropowej. Powyższe wyniki zachęcają do dalszych badań oraz wyjaśnienia wątpliwości. Całość opracowania i potwierdzony wkład Doktoranta w powstanie publikacji, wskazują na posiadane przez Niego doświadczenie, umiejętności i kompetencje naukowe w zakresie podjętej problematyki badawczej.

Wniosek końcowy

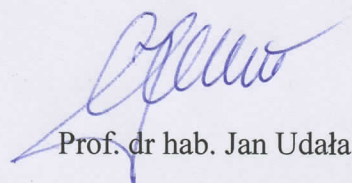
Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest zwartym opracowaniem przygotowanym w oparciu o trzy monotematyczne, wzajemnie uzupełniające się publikacje. Na bazie dociekań naukowych Autor uzyskał interesujące wyniki wzbogacające naszą wiedzę o procesach zachodzących w ośrodkowym układzie nerwowym i roli w ich regulacji

neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego. Praca, na obecnym etapie badań, ma znaczenie poznawcze, ale w przyszłości uzyskane wyniki mogą znaleźć zastosowanie praktyczne. Na szczególne podkreślenie zasługuje wszechstronny dobór metod badawczych, które pozwoliły Doktorantowi wykazać w warunkach in vivo wpływ BDNF na modulację aktywności neurohormonalnej sieci regulującej łaknienie na poziomie podwzgórza oraz regulację hormonów podwzgórzowo-przysadkowej osi gonadotropowej i somatotropowej. Zastosowanie interesujących rozwiązań metodycznych i duża konsekwencja w realizacji każdego etapu badań pozwoliły Autorowi w pełni wykonać postawione zadania i osiągnąć zamierzony cel. Wykonanie badań wymagało dobrego przygotowania teoretycznego, specjalistycznego sprzętu, dużych umiejętności manualnych i analitycznych. Uzyskane wyniki zachęcają do podjęcia dalszych prac w badanym obszarze wiedzy, są oryginalnym i twórczym osiągnięciem badawczym Doktoranta i przyczyniają się do rozwoju badań w dyscyplinie zootechnika i rybactwo oraz dyscyplinach pokrewnych.

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że praca doktorska mgr Bartosza Jarosława Przybyła pt. „Modulacyjne działanie neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) w regulacji osi gonadotropowej i somatotropowej na poziomie podwzgórze-przysadka u owcy” odpowiada wymaganiom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. ze zm. (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) w zw. z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669). Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk wniossek o dopuszczenie mgr Bartosza Jarosława Przybyła do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę sposób i formę przygotowania rozprawy, jej nowatorski i twórczy charakter, dużą wartość merytoryczną uzyskanych wyników, niezaprzeczalny wkład w rozwój badań z zakresu neuroendokrynologii oraz znaczenie dla rozwoju nauki, wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Szczecin, 29 stycznia 2022 roku



Prof. dr hab. Jan Udała