

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

Olsztyn 30.01.2015 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Haziak
**pt.: "Liposacharyd jako bezpośredni modulator aktywności układu podwzgórzowo-
przysadkowo-gonadotropowego u owcy – badania *in vivo* oraz *in vitro*"**

FORMALNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje dwie opublikowane prace oryginalne oraz merytoryczne opracowanie podjętego tematu w formie manuskryptu, które zawiera krótki przegląd aktualnego piśmiennictwa z określeniem hipotezy badawczej i celu naukowego podjętych badań, opis przeprowadzonych doświadczeń i metod analitycznych, jak również omówienie uzyskanych wyników badań wraz z wpływającymi z nich wnioskami. Powyższe opracowanie łącznie z wykazem piśmiennictwa oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim zajmuje 30 stron. Prace oryginalne zostały opublikowane w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej, których sumaryczny współczynnik oddziaływania IF aktualnie wynosi 3,184, a punktacja wg MNiSW – 50. Doktorantka jest pierwszym autorem obu tych publikacji. Załączone oświadczenia współautorów potwierdzają znaczący wkład Doktorantki w ich powstanie (oszacowany na 60% w odniesieniu do każdej z nich), który obejmował współdziałanie w opracowaniu koncepcji, celu i metodyki badań, przeprowadzenie doświadczeń, wykonanie analiz laboratoryjnych i statystycznych, współdziałanie w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu prac do druku. Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Haziak zostały wykonane w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt *im. Jana Kielanowskiego* PAN w Jabłonie pod kierunkiem dr hab. Doroty Tomaszewskiej-Zaremby, prof. nadzw. IFiZZ oraz dr. Andrzeja Hermana jako promotora pomocniczego.

Publikacje oryginalne Doktorantki stanowiące rozprawę doktorską:

1. **Haziak K.**, Herman A.P., Tomaszewska-Zaremba D. The effect of LPS on LH release and gene expression of LH-B, GnRH-R and TLR4 in the anterior pituitary of follicular phase ewes – an *in vitro* study. *J. Anim. Feed Sci.*, 2013, 22(2), 97-105.
IF=0,757
2. **Haziak K.**, Herman A.P., Tomaszewska-Zaremba D. Effects of central injection of anti-LPS antibody and blockade of TLR4 on GnRH/LH secretion during immunological stress in anestrous ewes. *Mediators of Inflammation*. Article ID 867170, 10 pages, 2014. doi:10.1155/2014/867170.
IF=2,417

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Wiele badań potwierdziło wpływ stanów zapalnych na procesy rozrodcze u samic, w tym także funkcjonowanie osi regulacyjnej podwzgórze-przysadka-jajnik. Wcześniej prowadzone badania w Zespole prof. Doroty Tomaszewskiej-Zaremby także potwierdziły hamujące działanie stresu immunologicznego na uwalnianie gonadoliberyny (GnRH) i wydzielanie hormonu luteinizującego (LH) u owiec. Wyjaśnienie sposobu oddziaływania układu odpornościowego na procesy rozrodcze ma duże znaczenie, ponieważ reakcje immunologiczne – wywołane przez różnego rodzaju infekcje – mogą przyczynić się do znacznego obniżenia wskaźników rozrodczych u człowieka i zwierząt. Temat rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Haziak jest aktualny i stanowi kontynuację wcześniejszych badań Promotorów pracy – prof. dr hab. Doroty Tomaszewskiej-Zaremby, nadzw. IFiZZ oraz dr. Andrzeja Hermana.

W załączonym opracowaniu, które uzupełnia prace oryginalne, dokonano przeglądu piśmiennictwa, dotyczącego podjętego tematu pracy. Doktorantka przedstawia w nim możliwe oddziaływania mediatorów układu odpornościowego na funkcjonowanie podwzgórzowo-przysadkowego systemu GnRH/LH u samic. Opis ten stanowi dobre wprowadzenie do prezentacji celów badań, realizowanych w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej. Generalnie obejmowały one: 1/ określenie wpływu endotoksyny bakteryjnej (LPS) na sekrecję LH na poziomie przysadki oraz 2/ zbadanie zmian w wydzielaniu GnRH/LH u owiec w odpowiedzi na stres immunologiczny (wywołany obwodowym podaniem LPS) w warunkach uwzględniających blokowanie możliwości działania LPS na poziomie podwzgórza. Badania realizowano jako dwa niezależne doświadczenia. W ramach pierwszego doświadczenia przeprowadzono hodowlę fragmentów (eksplantów) przysadek pochodzących od owiec w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego; kontrolnych lub otrzymujących dożylnie iniekcje LPS, wywołujące tzw. stres immunologiczny. W warunkach *in vitro* badano wpływ LPS w obecności GnRH lub GnRH w połączeniu z LBP (białkiem wiążącym LPS) na sekrecję LH przez eksplanty przysadkowe oraz po zakończeniu hodowli określano w nich ekspresję genów *LHβ*, *GnRH-R* i *TLR4*. Z kolei, w ramach drugiego doświadczenia, przeprowadzonego w warunkach *in vivo* na owcach w okresie anestrus, zbadano wpływ – po wcześniejszym podaniu do III komory mózgu przeciwciał anti-LPS lub przeciwciał wiążących komponenty TLR4 (anty-LBP i anty-MD-2) – dożylnych iniekcji LPS (wywołujących stres immunologiczny) na: a/ sekrecję LH i kortyzolu oraz b/ ekspresję określonych genów w wybranych strukturach podwzgórza (POA, AHA, MBH i ME) i przedniej części przysadki; w podwzgórzu – *GnRH*, *GnRH-R* i *TLR4*, a w przysadce – *LHβ*, *GnRH-R* i *TLR4*. Doświadczenie 1 (*in vitro*) przeprowadzono na owcach rasy czarnogłówka (n = 12), a Doświadczenie 2 (*in vivo*) – na owcach rasy polska długowłnista (n = 20). Na podkreślenie zasługują przemyślane układy doświadczalne, które pozwoliły na testowanie – na różnych poziomach – reaktywności systemu GnRH/LH na endotoksynę w warunkach eksperymentalnie wywołanego stresu immunologicznego. W badaniach zastosowano złożoną procedurę implantacji kaniul do III komory mózgu, umożliwiających podawanie czynników doświadczalnych bezpośrednio do ośrodkowego układu nerwowego. Na uznanie zasługuje również szeroki zakres przeprowadzonych analiz, które obejmowały badanie (metodą Real-Time PCR) ekspresji genów *GnRH*, *GnRH-R*, *LHβ* i *TLR4* w strukturach powiązanych z podwzgórzowo-przysadkowym systemem GnRH/LH, a także oznaczanie metodą radioimmunologiczną stężenia LH w mediach hodowlanych i krwi obwodowej oraz kortyzolu we krwi obwodowej.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania dostarczyły szereg interesujących wyników. Na szczególne podkreślenie zasługują następujące ustalenia:

- **w ramach badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro*** (Doświadczenie 1), **takie jak:**
 - hamowanie stymulowanej przez GnRH **sekrecji LH** przez eksplanty przysadek pochodzących od owiec kontrolnych oraz owiec będących w stresie immunologicznym zarówno w obecności LPS, jak i LPS z LBP w mediach hodowlanych;
 - obniżenie stymulowanej przez GnRH **ekspresji genu *GnRH-R*** oraz **genu *LHβ*** w eksplantach przysadek pochodzących od owiec kontrolnych – jedynie w obecności LPS i LBP w medium hodowlanym, a w eksplantach przysadek od zwierząt będących w stresie immunologicznym – zarówno w obecności samego LPS, jak i LPS z LBP;
 - wyższa **wrażliwość na działanie LPS lub LPS z LBP** (w zakresie ekspresji genów *LHβ* i *GnRH-R*) eksplantów przysadek owiec w stresie immunologicznym w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi;
 - **obniżenie ekspresji genu *TLR4*** w eksplantach przysadek owiec kontrolnych – w obecności GnRH i LPS lub GnRH z LPS i LBP w medium oraz owiec w stresie immunologicznym – w obecności GnRH i LPS w medium, przy braku wpływu samej gonadoliberyny na ekspresję genu tego receptora;
- **z kolei w ramach badań przeprowadzonych w warunkach *in vivo*** (Doświadczenie 2), **takie jak:**
 - **wzrost wydzielania kortyzolu** pod wpływem stresu immunologicznego wywołanego dożylnym podaniem LPS, niezależnie od wcześniejszego podawania do III komory zwierzętom doświadczalnym przeciwciał anti-LPS lub przeciwciał wiążących składowe receptora TLR4 (anty-LBP i anty MD-2);
 - **obniżenie sekrecji LH** w warunkach stresu immunologicznego, niezależnie od wcześniejszego podania do III komory przeciwciał anti-LPS lub przeciwciał blokujących receptor TLR4 (anty-LBP i anty MD-2);
 - **obniżenie ekspresji genu *LHβ*** w przedniej części przysadki owiec w warunkach stresu immunologicznego, przy czym wcześniejsze podanie do III komory przeciwciał anti-LPS nie ograniczało tego efektu a podanie przeciwciał blokujących receptor TLR4 całkowicie go znosiło;
 - **obniżenie ekspresji genu *GnRH*** w POA w warunkach stresu immunologicznego, niezależnie od wcześniejszego podania do III komory przeciwciał anti-LPS lub przeciwciał blokujących receptor TLR4;
 - **obniżenie poziomu mRNA *GnRH*** w ME po zastosowaniu LPS i zniesienie tego efektu przez wcześniejsze podanie do III komory przeciwciał anti-LPS lub przeciwciał blokujących receptor TLR4;
 - **obniżenie ekspresji genu *GnRH-R*** w ME i przedniej części przysadki w warunkach stresu immunologicznego, któremu nie przeciwdziało wcześniejsze podanie do III komory przeciwciał anti-LPS lub przeciwciał blokujących receptor TLR4;
 - **występowanie ekspresji genu *TLR4*** w badanych strukturach podwzgórza (POA, AHA, MBH i ME) oraz przedniej części przysadki owiec, która nie podlegała istotnym zmianom pod wpływem obwodowo podanego LPS, jednakże poziom mRNA TLR4 w MBH, ME i przysadce był modulowany (stymulacja w MBH i ME, a hamowanie

w przysadce) przez przeciwciała anti-LPS i/lub przeciwciała blokujące receptor TLR4, podawanie do III komory.

Generalnie, badania przeprowadzone przez mgr Karolinę Haziak dokumentują możliwość oddziaływania endotoksyny (LPS) na różne elementy systemu GnRH/LH u owiec, tj. ekspresję genu *GnRH*, *GnRH-R* i podjednostki β LH, które prowadzi do obniżenia sekrecji LH. Doktorantka po raz pierwszy zastosowała w swoich badaniach hodowlę eksplantów przednich przysadek do testowania wpływu LPS na wydzielanie LH u owiec. Wykazały one możliwość działania LPS w przysadce na sekrecję LH, a także znaczenie statusu immunologicznego w tym procesie, objawiające się większą wrażliwością (w zakresie ekspresji genów *LH β* i *GnRH-R*) – na działanie LPS lub LPS z LBP – przysadek owiec będących w stresie immunologicznym w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Badania Doktorantki, przeprowadzone w warunkach *in vivo*, także potwierdziły wpływ LPS na sekrecję LH na poziomie przysadki, ponieważ – zastosowane w nich – dożylnie iniekcje LPS również hamowały wydzielanie LH po podaniu do III komory mózgu przeciwciał anti-LPS lub przeciwciał blokujących receptor TLR4. W tych warunkach, także skutecznie hamowana była przysadkowa ekspresja genu *GnRH-R*. Z kolei, ekspresja genu *LH β* podlegała hamowaniu u owiec w warunkach stresu immunologicznego tylko po dokomorowym zastosowaniu przeciwciał anti-LPS, natomiast nie zmieniała się istotnie po zablokowaniu TLR4 (w porównaniu z poziomem stwierdzonym u zwierząt kontrolnych). Ta obserwacja została wnikliwie przeanalizowana w drugiej publikacji. Oprócz hamującego działania LPS na poziomie przysadki (poprzez TLR4) na wydzielanie LH w warunkach stresu immunologicznego, dodatkowo przedstawiono sugestię dotyczącą potencjalnego udziału cytokin prozapalnych w tym procesie. Sugestia ta jest w pełni uzasadniona, jednakże trzeba również wziąć pod uwagę fakt, że przyczyn rozbieżności pomiędzy zmianami w ekspresji genu podjednostki β LH i sekrecji tego hormonu może być wiele i dalsze badania są niezbędne aby wyjaśnić ten problem. Na podkreślenie zasługują wnikliwe dyskusje, zamieszczone w opublikowanych pracach, poświęcone uzyskanym wynikom. W dyskusjach tych wykorzystano najnowsze piśmiennictwo dotyczące podjętego problemu badawczego. W podsumowaniu badań opublikowanych w dwóch pracach oryginalnych, Doktorantka prezentuje 3 wnioski, charakteryzujące się wysokim stopniem uogólnienia. Wnioski te znajdują potwierdzenie w prezentowanych wynikach badań. Oczekiwałbym jedynie szerszego rozwinięcia pierwszego wniosku w zakresie stwierdzonej zależności modulującego działania LPS na sekrecję LH od stanu fizjologicznego zwierzęcia, ponieważ ten aspekt w niewielkim stopniu był podejmowany zarówno w publikacjach jak i w załączonym podsumowaniu badań. Inne uwagi i pytania dotyczące rozprawy doktorskiej są przedstawione w kolejnej części recenzji.

PYTANIA i UWAGI

1. Dlaczego w badaniach, które stanowią określoną całość, użyto owce różnych ras; polską długowelnistą i czarnogłówkę?
2. Angielski odpowiednik „wyniosłości przyśrodkowej” to „*medial eminence*”, a nie „*median eminence*”, który odnosi się do „wyniosłości pośrodkowej” (*Posumowanie*, str. 12).
3. Dlaczego podano różne czasy trwania inkubacji na Fig. 1 i Fig. 2 w pierwszej publikacji?

4. W opublikowanych pracach zastosowano różny sposób oznakowania istotnych różnic pomiędzy wartościami średnimi; w pierwszej publikacji duże litery odpowiadają $P < 0.01$, a małe – $P < 0.05$, natomiast w drugiej publikacji dużym literom przypisano niższy poziom istotności ($P < 0.05$), a małym – wyższy ($P < 0.01$). Bardziej przystępne dla czytelnika byłoby zastosowanie jednolitego sposobu oznakowania różnic statystycznych w obu pracach.
5. W pierwszej publikacji, z Fig. 5 wynika, że nie było istotnej różnicy we ekspresji genu TLR4 pomiędzy grupami: „GnRH control” i „GnRH+LPS+LBP” w obrębie owiec, którym przyżyciowo podawano LPS. Z kolei, z informacji – podanej w podsumowaniu przeprowadzonych badań (str. 29; wiersze od góry 5-9) – można wnioskować, że istotna różnica wystąpiła pomiędzy wymienionymi grupami. Jak było w rzeczywistości?
6. We *Wstępie* (str. 16) zwrócono uwagę na możliwość oddziaływania IL-1 β na neurony GnRH przy współdziałaniu endogennych peptydów opioidowych (EOP). Czy, zdaniem Pani, istnieje możliwość udziału EOP w oddziaływaniu stresu immunologicznego na poziomie przysadki w odniesieniu do wydzielania LH? Pytanie to nawiązuje do *Dyskusji* zamieszczonej w drugiej publikacji (str. 7, ostatni akapit).
7. Wnioski końcowe zamieszczone w drugiej publikacji robią wrażenie nadmiernie zawężonych, ponieważ odnoszą się do ekspresji genu *LH β* i sekrecji LH tylko po dokomorowym podaniu przeciwciał blokujących receptory TLR4, a nie uwzględniają innych, interesujących wyników badań przedstawionych w tej pracy.
8. Spośród stosunkowo nielicznych usterek redakcyjnych, które zauważyłem w opublikowanych pracach, pozwolę sobie wskazać niejasno sformułowane zdanie w drugiej publikacji (ostatni akapit na str.1), rozpoczynające się od ”It was shown that...”.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu należy stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Haziak zawiera liczne i wartościowe wyniki badań, które opublikowano w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, których sumaryczny współczynnik oddziaływania IF wynosi 3,184, a punktacja wg MNiSW – 50. Przedstawione badania dostarczają nowych informacji dotyczących złożonego mechanizmu oddziaływania stresu immunologicznego na system GnRH/LH, kontrolujący procesy rozrodcze. Wskazują one m.in. na możliwość bezpośredniego oddziaływania endotoksyny LPS – na poziomie przysadki – w odniesieniu do wydzielania LH u owiec. Przeprowadzenie badań przedstawionych w ocenianej rozprawie doktorskiej wymagało dużego nakładu pracy i zastosowania złożonych procedur doświadczalnych, a w szczególności umiejętne podłączenia klasycznych technik badawczych z nowoczesnymi. Przekonany jestem, że Doktorantka realizując badania w ramach prezentowanej rozprawy w pełni osiągnęła zamierzony cel naukowy i nabyła umiejętność prowadzenia badań na wysokim poziomie naukowym. Przedstawione w niniejszej opinii uwagi/pytania nie obniżają merytorycznej wartości rozprawy a jedynie mogą być przydatne w planowaniu dalszych badań.

WNIOSEK KOŃCOWY

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa zatytułowana **”Liposacharyd jako bezpośredni modulator aktywności układu podwzgórzowo-**

przysadkowo-gonadotropowego u owcy – badania *in vivo* oraz *in vitro*” spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie nr 595 o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14. 03.2003 r. (wraz z późniejszymi zmianami) – stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt *im. Jana Kielanowskiego* PAN w Jabłonie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Karoliny Haziak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stanisław Okrasa

S Okrasa