

Dr hab. Joanna H. Śliwowska  
Pracownia Neurobiologii  
Instytut Zoologii  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Hodowli Zwierząt  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wojska Polskiego 71c  
60-625 Poznań

Poznań, 11.05.2015

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ  
PANI MAGISTER INŻYNIER MAGDALENY CIEŚLAK**

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Cieślak zatytułowana „Stresogenny wpływ wczesnego przerwania odchowu przy matce na wydzielanie hormonów gonadotropowych w trakcie rozwoju jagniąt” została wykonana w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonce pod opieką Pani dr hab. Mary Wańkowskiej, prof. nadzw.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma 85 stron. Praca składa się z następujących części: spisu skrótów ( $\frac{3}{4}$  strony), spisu treści (1 strona), wstęp ( $7 \frac{1}{2}$  strony), cel badań ( $\frac{1}{2}$  strony), materiały i metody (15 stron), wyniki (4 strony opisu i 11 rycin), dyskusja (15 stron), posumowanie ( $1 \frac{1}{2}$  strony), wnioski ( $1 \frac{1}{4}$  strony), bibliografia ( $14 \frac{1}{2}$  strony), streszczenie w języku polskim (3 strony), streszczenie w języku angielskim ( $2 \frac{3}{4}$  strony), spis rycin i spis tabel. Ponadto praca zaopatrzona jest w oświadczenie promotora i autora pracy. Proporcje poszczególnych części są odpowiednie.

Informacje zawarte we **wstępie** przedstawione są w zwięzły i zrozumiały sposób. W tej części Autorka porusza zagadnienie rozwoju ontogenicznego z podziałem na okres prenatalny i postnatalny. Następnie omówione zostały okresy rozwoju postnatalnego owiec oraz rola matki w rozwoju osobniczym z podkreśleniem wpływu na osie podwzgórze-przysadka mózgowa-nadnercza (PPN) oraz podwzgórze-przysadka mózgowa-gonady (PPG). Na s. 6 znajduje się rycina przedstawiająca „fazy

postnatalnego etapu ontogenezy u owcy”, która wzbogaca treść tego rozdziału ale użyta czcionka jest mała co utrudnia czytanie.

Autorka omawiając zagadnienia związane ze stresem odwołuje się do pojęcia zaburzenia homeostazy (s. 7). Natomiast nie zostały omówione inne koncepcje reakcji stresowych, np. allostaza (McEwen 1998 *Stress, adaptation and disease. Allostasis and allostatic load, Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840:33-44), czy ta zaporopnowana przez Romero (Romero LM et al., *The Reactive Scope Model – a new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. Horm. Behav.* 55:375-89).

Przy omawianiu zmniejszonej aktywności osi PPN u szczurów będącej wynikiem krótkotrwałej separacji od matki w okresie prenatalnym należało cytować wcześniejsze oryginalne prace twórcze prekursora w tej dziedzinie Profesora Levine (np. Wiener SG, Levine S *Perinatal malnutrition and early handling: interactive effects on the development of the pituitary-adrenal system. Dev Psychobiol.* 1978 Jul;11(4):335-52). Niewątpliwie prace Profesora Meaney’a są bardzo ważne ale nie są one pierwszymi w tym zakresie (s. 8).

W dalszej części Doktorantka przechodzi do przedstawienia przesłanek skłaniających do prowadzenia badań wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, tj. braku badań nad: 1) konsekwencjami długotrwałego odstawienia od matki u owiec; 2) zróżnicowaniem płciowym w reakcji stresowej po przerwaniu odchowu przy matce (s. 8). Następnie Pani mgr inż. Cieślak przedstawia stan wiedzy w zakresie wpływu wczesnego stresu spowodowanego odstawieniem od matki na funkcje osi PPG i PPN powołując się na literaturę światową, jak i wcześniejsze badania prowadzone w jednostce macierzystej. Ta część pracy jest dobrze i szczegółowo opisana wskazując na dobrą znajomość tematu. Szkoda tylko, że Autorka nie pokusiła się o próby wyjaśnienia mechanizmów epigenetycznych działania wczesnego stresu, co stanowi bardzo ciekawy i ważny kierunek w badaniach nad wczesnym programowaniem osi PPG i PPN. Pomocna w tym zakresie może być następująca praca przeglądowa - Weaver IC *Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. Nature versus nurture: let's call the whole thing off. Epigenetics.* 2007 Jan-Mar;2(1):22-8.

Z kolei Autorka przechodzi do przedstawienia **celu badań i postawienia hipotezy badawczej**, która zakłada, że odsadzenie na początku 6 tygodnia życia ma długotrwały hamujący wpływ na wydzielanie hormonów gonadotropowych i zmienia uwalnianie testosteronu i kortyzolu u jagniąt. Ponadto Autorka zakłada, że wpływ odsadzenia jest zróżnicowany płciowo. Można było postawić dwie niezależne hipotezy (dla przejrzystości).

Następną część stanowi rozdział „**Materiały i metody**”. Pani mgr inż. M. Cieślak prowadziła badania na grupie zwierząt kontrolnych i doświadczalnych obu płci odstawianych w różnych okresach od matki. Schemat eksperymentu jest niewątpliwie skomplikowany ale jego przedstawienie w postaci

diagramu (zamiast tabel, s. 15 i 17) ułatwiłoby szybsze zrozumienie przebiegu eksperymentu. Ponadto Autorka stosuje liczebniki w formie słownej i cyfr co dodatkowo wprowadza komplikacje (s. 15). Ta część pracy jest napisana w najmniej przystępny sposób z zastosowaniem skrótów myślowych. Ponadto nie znalazłam w tym rozdziale odpowiedzi na kilka ważnych merytorycznie kwestii:

- Dlaczego Autorka nie badała poziomu ACTH?
- Nie wiadomo jak długo „materiał mózgowy” został utrwalony w 4 % paraformaldehydzie (s. 17). Lepiej użyć określenia przysadki mózgowej a nie „materiał mózgowy” (s. 17).
- W opisie metody IHC nie podano stężeń przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych (s. 19).
- Czy Autorka oprócz kontroli absorpcji przeciwciał z syntetycznymi antygenami, które są niezwykle istotne prowadziła również kontrole z ominięciem przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych (s. 19) ?
- Zamiast „opisowej i metrycznej analizy obrazu” lepiej użyć sformułowania „analiza jakościowa i ilościowa obrazów” (s. 20).
- Na s. 18 i 20 podana jest informacja, iż analizę wykonano na co 40 skrawku podczas gdy wcześniej napisano, iż kolekcjonowano tylko 4 skrawki z każdej przysadki mózgowej. Proszę o wyjaśnienie tej nieścisłości.
- Na s. 21 Doktorantka stosuje skróty LH i FSH natomiast nie stosuje skrótów dla kortyzolu (powszechnie używa się CORT) i testosteronu (powszechnie używa się T<sub>4</sub> lub T). Warto ujednolicić system skrótów i konsekwentnie go stosować w całej pracy.

Z kolei Autorka przechodzi do przedstawienia **wyników** badań w formie opisowej oraz w postaci 11 rycin. Wyniki można było podzielić na dane hormonalne – obejmujące RIA dla CORT, LH, FSH i T<sub>4</sub> oraz oznaczenia HHC i IHS dla LH i FSH. Wówczas dane byłyby bardziej przejrzyste. Ryciny zawierają dużo informacji a zamieszczona legenda i umieszczenie najważniejszych wniosków wynikających z ich analizy ułatwia ich zrozumienie. Nie wiadomo dlaczego Doktorantka dokonała analizy masy jąder a nie dokonała analizy masy jajników (s. 25). Ponadto Autorka dokonała analizy makroskopowej jajników ale nie dokonała analogicznej analizy dla jąder (s. 25). W celu przedstawienia różnic między płciami w stężeniu hormonów lepiej byłoby zestawić na tym samym wykresie dane dotyczące obu płci .

Następny rozdział stanowi **dyskusja**, w którym Doktorantka omawia silne zróżnicowanie płciowe przejawiające się zróżnicowaniem w odpowiedzi kortyzolu u jagniąt wcześniej odsadzanych od matki. Ta część jest dobrze napisana w oparciu o najnowszą literaturę. Autorka porównuje badania na owcach i gryzoniach. W dalszej części dyskusji Autorka omawia wpływ hormonów płciowych

(estrogenu i testosteronu) na regulację reakcji stresowej (określanej w pracy skrótami pochodzącymi z języka angielskiego - oś HPA) oraz dynamikę wrażliwości osi HPA w czasie postnatalnej ontogenezy. Do tej części mam kilka uwag:

- Na s. 21 Doktorantka stosuje skróty LH i FSH natomiast nie stosuje się skrótów dla kortyzolu (powszechnie używa się CORT) i testosteronu (powszechnie używa się T<sub>4</sub>).
- S. 44 – lepiej użyć „programują” odpowiedź „osi” HPA niż „układu” HPA.
- S. 44 - wprowadzono skrót ACTH bez podania pełnej nazwy i polskiego odpowiednika. Moim zdaniem samo umieszczenie skrótów w spisie na początku pracy nie wystarcza.
- S.44 - doktoranta napisała: „sama tylko stymulacja dotykowa hamuje zwiększanie uwalniania ACTH w odpowiedzi na odseparowanie od matki, natomiast nie blokuje wzrostu uwalniania kortykosteronu” nie wyjaśniając dlaczego ta się dzieje.

W podsumowaniu Autorka wyciąga wnioski (s. 47), iż odsadzenie zmienia długotrwale uwalnianie kortyzolu, a natężenie reakcji stresowej jest zmienne w czasie. Ponadto odpowiedź CORT na odsadzenie jest zróżnicowane płciowo po 9 tygodniu życia. Stąd proces przerywania odchowu przy matce wpływa na aktywność osi HPA, która jest zależna od płci i regulowana przez hormony płciowe.

Następna część dyskusji dotyczy wpływu wczesnego przerywania odchowu przy matce na wydzielanie hormonów gonadotropowych (s 48-57). Proponuję zmienić sformułowanie „przed tą pracą nie badano wpływ reakcji stresowej podczas odchowu przy matce na wydzielanie hormonów gonadotropowych i testosteronu...” na „badania te są pierwszymi pokazującymi wpływ reakcji stresowej ....” (s. 48). Podobne sformułowanie użyto na s. 53.

Doktorantka badała wpływ odsadzenia na zmiany w poziomie T<sub>4</sub>, dlaczego nie przeprowadzono analogicznych badań nad poziomem E<sub>2</sub> u samic? Na s. 54 Doktorantka dyskutuje przeciw wcześniejsze wyniki badań (Wańkowska i wsp. 2010a) wskazujące na możliwe działanie wzmożonego ujemnego wpływu estrogenów na wydzielanie LH pod wpływem estrogenów.

Autorka z kolei tłumaczy zmiany zachodzące u samców odsadzonych uaktywnieniem sprzężenia zwrotnego testosteronu i zwiększenie androgenyzy. U samic natomiast wpływ stresu wczesnego przerywania odchowu przy matce (w fazie juwenilnej) skutkuje hamowaniem syntezy, akumulacji i uwalniania LH oraz gromadzenia FSH.

Kolejny rozdział to **podsumowanie**. W tej części Autorka jeszcze raz podsumowuje wyniki swoich badań. Ta część jest w moim odczuciu niepotrzebna zważywszy na to, iż po nie znajdują się Wnioski oraz Streszczenie. Choć obecność tego rozdziału może wynikać z przyjętych zasad w instytucji, w której prowadzono badania.

Praca zawiera pięć **wniosków** przedstawionych od ogólnych do szczegółowych. W ostatnim wniosku Doktorantka stwierdza, że przeprowadzone przez Nią badania w dużej mierze potwierdziły trafność postawionej hipotezy badawczej. Przeprowadzone eksperymenty potwierdzają, iż wczesne przerwanie odchowu przy matce zmienia uwalnianie kortyzolu i testosteronu oraz ma hamujący wpływ na wydzielanie LH u jagniąt. Ponadto stwierdza się, że wpływ ten jest długotrwały i zróżnicowany płciowo. Jednocześnie Autorka zauważa, że w przypadku FSH wynik odstawiania jest długotrwały i pozytywny u samców a u samic krótkotrwały i negatywny.

Po rozdziale „Wnioski” znajduje się **bibliografia**, która jest obszerna, obejmuje 14 ½ strony i przygotowana z dużą skrupulatnością. **Streszczenie** zarówno w języku polskim, jak i angielskim znajduje się na końcu pracy. Może to znowu wynikać z przyjętego schematu w jednostce. Osobiście wolałabym aby streszczenie znajdowało się ono na początku rozprawy doktorskiej. W tej części przydałyby się bardziej wyróżnione akapity (np. zdania s. 77 zaczynające się od „Proces dojrzewania gonad u owcy...” oraz „Postanowiono rozwinąć badania w kierunku...” a także s.79 „Podsumowując wyniki...” można zacząć od nowych akapitów). U samców polskiej Owcy długowłosej (s. 77) – słowo owca powinno być z małej litery. Słowo „pryzwalających” proponuję zastąpić „korzystnych” (s. 77). Ponadto słowo : „sześć „ raz napisane zostało słownie a raz w postaci cyfry (proponuję ujednoczyć – s. 77). Na kolejnej stronie to samo dotyczy słowo „sześć” i cyfra „5”. Pomimo tych drobnych niedociągnięć ta część jest dobrze i zwięźle napisana. Zdanie: “In sheep timing of puberty is sexually differentated “ proponuję zamienić: na sexually dimorphic (s.80). Na tej samej stronie “ It was decided to investigate” proponuję zamienić “We investigated” . Ponownie w stawianej hipotezie zamiast “sexually differentiated manner” proponuję “ in sexually dimorphic manner”. W kolejnym zdaniu zamiast “it was decided to check” poponuję “we examined” albo “ we investigated”. Zdanie “This stress contributes.....” (s. 81) powinno brzmieć “ Thus, stress contributes....” S. 82 sformułowanie “sexually differentiated “ proponuję zamienić na “sexually dimorphic”.

**Spis rycin i tabel** to ostatnie części dysertacji i nie budzą one zastrzeżeń.

### **Wnioski końcowe**

Praca pod względem edytorskim napisana jest bardzo dobrze i z dużą skrupulatnością. Świadczy to o dużej staranności w przygotowaniu rozprawy przez Doktorantkę i za pewne również dużym wkładzie Promotora pracy. Praca zawiera wszystkie niezbędne części wymagane w stosunku do rozprawy doktorskiej a ich proporcje są prawidłowe. Jeśli autorka zamierza w przyszłości opublikować wyniki badań prezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej proponuje dokonać kilku zmian. Część dotycząca układu doświadczalnego jest skomplikowana ale przedstawienie jej w postaci schematu (zamiast tabeli) mogłoby ułatwić jej zrozumienie. Przydatne byłoby również przedstawienie danych

dotyczących samic i samców, które są przecież porównywane na jednym wykresie, co umożliwiłoby śledzenie istotnych statystycznie zmian. Proponuję również rozwinąć wstęp i dyskusję o dodanie informacji dotyczących mechanizmów epigenetycznych działających na osie PPG i PPN w omawianym modelu.

Powyższe uwagi nie obniżają jakości pracy i nie umniejszają jakości prowadzonych badań oraz uzyskanych ważnych dla nauki podstawowej oraz medycyny weterynaryjnej wyników. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania nad zróżnicowaną płciowo reakcją stresową w odpowiedzi na przerwanie odchowu przy matce są bardzo cenne ze względów poznawczych. Niezwykle interesującym wynikiem jest również płciowo-zależna odpowiedź FSH na odstawienie od matki.

Stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Cieślak „Stresogenny wpływ wczesnego przerwania odchowu przy matce na wydzielanie hormonów gonadotropowych w trakcie rozwoju jagniąt” spełnia wszystkie wymagania określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr inżynier Magdaleny Cieślak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

  
Dr hab. Joanna H. Śliwowska