



INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn 5; skr. poczt. 55 tel. (4889) 523-46-86; (4889) 524-03-13
fax (4889) 524-01-24; e-mail: institute@pan.olsztyn.pl; www.pan.olsztyn.pl

ODDZIAŁY: ENDOKRYNOLOGII I PATOFIZJOLOGII ROZRODU
NAUKI O ŻYWNOŚCI

Doc. dr hab. Janina Skipor
Zakład Lokalnych Regulacji Fizjologicznych
IRZiB PAN w Olsztynie

Olsztyn, 22 czerwca 2009

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Magdaleny Olgi Cechanowskiej

**pt. "Ekspresja genów GnRH i receptora GnRH w układzie podwzgórzowo-przysadkowym
owcy w różnych stanach fizjologicznych; wpływ czynników stresogennych"**

Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Franciszka Przekopa w Zakładzie Neuroendokrynologii Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie.

Procesy rozrodcze u ssaków zachodzą pod kontrolą wielopoziomowego systemu neurohormonalnego, działającego na osi podwzgórze-przysadka-gonady. Hormonem nadrzędnym tej osi jest syntetyzowana w podwzgórzu gonadoliberyna, wpływająca na aktywność gonadotropową przysadki. Za badania nad strukturą GnRH Schally i Guillemin otrzymali Nagrodę Nobla w 1977 roku. W rozwój badań nad tą cząsteczką swój wkład wniósł również zespół kierowany przez prof. Eugeniusza Domańskiego z Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt w Jabłonie. W roku 1964 zespół opublikował wyniki badań, które wykazały obecność peptydu stymulującego funkcje rozrodcze nie tylko w przednim i tylnym podwzgórzu ale również w wyniosłości pośrodkowej. Poczynając od tego okresu, w Instytucie prowadzone są intensywne badania nad neuroendokrynną regulacją procesów rozrodu owiec w warunkach fizjologicznych, jak również w warunkach stresogennych. Badania te nie byłyby możliwe bez doskonałej techniki, opracowanej i wdrożonej do badań między innymi przez

profesora Franciszka Przekopa, pozwalającej na ocenę funkcji podwzgórza i przysadki u owiec w długotrwałych doświadczeniach.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest, w pewnym stopniu, kontynuacją badań mechanizmów regulujących sekrecję gonadoliberyny (GnRH) u owiec w różnych stanach fizjologicznych, oraz w warunkach stresogennych. Praca ta po raz pierwszy przedstawia wpływ stanu aktywności rozrodczej owcy, czynników stresowych oraz rolę neuralnych układów hamujących uwalnianie GnRH (układ CRH-ergiczny i β -endorfinergiczny) na poziom ekspresji genu GnRH i genu receptora GnRH w strukturach układu podwzgórzowo-przysadkowego. W związku z tym, należy podkreślić, że zagadnienia poruszane przez Doktorantkę są aktualne. Badania te mają dużą wartość poznawczą, umożliwiają bowiem interpretację zjawisk zachodzących w układzie regulującym syntezę i sekrecję GnRH/LH u owiec na poziomie molekularnym. Istnieją dane wskazujące, że regulacja sekrecji GnRH może odbywać się przez krótką i ultrakrótką pętlę sprzężenia zwrotnego. Warunkiem niezbędnym do działania tych pętli regulacyjnych jest istnienie dróg umożliwiających oddziaływanie GnRH i LH bezpośrednio na aktywność sekrecyjną neuronów GnRH, lub pośrednio przez system interneuronów. Wykazanie przez Doktorantkę obecności receptora GnRH w podwzgórzu owiec przyczyni się niewątpliwie do przybliżenia odpowiedzi na pytanie o molekularne podłoże oddziaływania GnRH na własną biosyntezę i sekrecję.

CHARAKTERYSTYKA PRACY I UWAGI

Oceniana rozprawa obejmuje 142 strony maszynopisu, 23 złożone rysunki, 2 tabele, 1 zdjęcie oraz 261 pozycji piśmiennictwa i zawiera typowe dla rozprawy doktorskiej rozdziały.

Na szesnastu stronach „Wstępu”, podzielonego na 8 tematycznych podrozdziałów, Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje na temat funkcjonowania systemu neurohormonalnego, odgrywającego nadrzędną rolę w kontroli procesów rozrodczych ssaków. W kolejnych podrozdziałach została krótko opisana nadrzędna rola GnRH w regulacji osi podwzgórze-przysadka-gonady, budowa cząsteczki GnRH i receptora GnRH, rozmieszczenie komórek GnRH-ergicznych w obszarze przedwzrostowym i w podwzgórzu oraz rola układów neuronalnych w regulacji sekrecji gonadotropin. W oddzielnych podrozdziałach opisano również fotoperiodyczną kontrolę aktywności płciowej owcy i kontrolę sekrecji gonadotropin w poszczególnych fazach cyklu rozrodczego. Szerzej został omówiony wpływ aktywacji osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej na aktywność układu podwzgórze-przysadka-gonady. Wiadomości te przedstawiła Doktorantka w oparciu o aktualne dane zawarte w

publikacjach polskich, jak również zagranicznych zespołów badawczych, co dowodzi dobrej znajomości literatury.

Wielopiętrowość neuroendokrynnych regulacji procesów rozrodu samicy stwarza potrzebę wypracowania przystępnego sposobu ich prezentacji. We wstępie Doktorantka zamieściła ryciny, które znakomicie obrazują rozmieszczenie i wzajemne oddziaływanie układów neuronalnych, biorących udział w regulacji aktywności sekrecyjnej GnRH/LH. Ryciny te znacznie podnoszą komunikatywność tego rozdziału.

Następny, dwustronicowy rozdział „Założenia i cel pracy” zawiera uzasadnienie podjętych badań wraz z celami pracy. Cele pracy przedstawiono w sposób precyzyjny, bowiem dokładnie odzwierciedlają podjęte zadania badawcze.

Rozdział „Materiał i Metody” zawiera, na 13 stronach, opis przeprowadzenia doświadczeń w warunkach *in vivo* oraz omówienie stosowanych technik badawczych i analiz statystycznych. Ze względu na brak precyzji i pewne niedopowiedzenia w opisie niektórych elementów podanej metodyki pojawia się konieczność postawienia kilku pytań i uwag. Zgodnie z Ustawą o doświadczeniach na zwierzętach (21 stycznia 2005 r) wszelkie badania z udziałem zwierząt muszą uzyskać zgodę Krajowej lub Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach. Badania prowadzone przez Doktorantkę zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną, co wynika z informacji zamieszczonych w publikacjach Doktorantki. Informacja ta powinna być zostać umieszczona również w podrozdziale „Zwierzęta Doświadczalne”. Z informacji zawartych w tym samym podrozdziale wynika, że badania przeprowadzono na 60 owcach, co nie pokrywa się z ilością zwierząt ujętą w szczegółowym opisie układów doświadczalnych. Z moich obliczeń wynika, że badania przeprowadzono na 72 owcach, przyjmując, że w każdej grupie badawczej było po 6 zwierząt. W podrozdziale „Synteza cDNA” nie podano informacji na temat postępowania z cDNA. Czy w celu jednoznacznego potwierdzenia prawidłowości wykonanej reakcji, uzyskane produkty reakcji PCR poddano sekwencjonowaniu?

Rozdział „Wyniki” obejmuje 39 stron oraz 14 złożonych rycin, 1 tabelę i 1 zdjęcie. Przyjęte przez Doktorantkę rozwiązanie przedstawiania wyników w tematycznych podrozdziałach znacznie ułatwia poruszanie się wśród tak dużej ilości wyników, które z uwagi na wspólny obiekt badań – ekspresję genów GnRH i GnRH-R, są do siebie wizualnie zbliżone. Sposób omówienia wyników w poszczególnych podrozdziałach jest nietypowy. Przeglądając

pracę po raz pierwszy byłam tą formą nieco zaskoczona i zadałam pytanie, czemu ta forma ma służyć. W pierwszej kolejności uznałam, że zasada umieszczania rysunków po jednej stronie i omawiania wyników, które te rysunki przedstawiają może być pomocna w przedstawianiu właśnie takich dwukrotnie - a nawet kilkakrotnie złożonych rysunków. W niektórych rysunkach pojawiły się niezgodności z tekstem, niezgodności te podaję w „uwagach szczegółowych”.

Pragnę podkreślić, że o ile do formy przedstawienia wyników mam pewne uwagi, to wyniki pracy uznaję za bardzo wartościowe. Pani mgr Marta Ciechanowska, w ramach swojej rozprawy doktorskiej wykazała, po raz pierwszy ekspresję genu receptora GnRH w podwzgórzu u owiec. Ponadto dowiodła, że poziom ekspresji genu tego receptora w badanych strukturach podwzgórza, oraz w przysadce jest wyższy u estralnych owiec, niż u owiec w okresie spokoju płciowego. Również ekspresja genu GnRH, stwierdzona tylko w strukturach podwzgórza, była u owiec estralnych wyższa, niż u owiec w okresie anestrus. U owiec, w fazie lutealnej i pęcherzykowej cyklu estralnego średnie stężenie LH i częstotliwość pulsów były istotnie wyższe, niż obserwowane u owiec anestralnych. W tym miejscu zabrakło mi określenia, że obserwowany równoczesny wzrost poziomu ekspresji genów GnRH i GnRH-R i wydzielania LH świadczy o zależności wydzielania LH od ekspresji tych genów w strukturach podwzgórza-przysadka. Doktorantka podkreśliła porównywalny poziom ekspresji genu GnRH w obszarze przedwzrokowym, w przednim i brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu we wszystkich badanych okresach. Zabrakło mi tu takiej samej analizy w odniesieniu do poziomu ekspresji genu receptora GnRH, szczególnie w odniesieniu do badanych struktur podwzgórza. Z danych zamieszczonych na Rysunku 4.1.3. (B) wynika, że w fazie pęcherzykowej cyklu ekspresja GnRH-R jest wyższa w brzuszno-pośrodkowym podwzgórzu, niż w innych jego strukturach. Zabrakło również porównania poziomu ekspresji obu genów w badanych fazach cyklu rujowego: lutealnej i pęcherzykowej.

Badając wpływ stresu krótkotrwałego i o przedłużonym działaniu na ekspresję genów GnRH i GnRH-R u owiec w okresie sezonowego anestrus i fazy pęcherzykowej cyklu estralnego Doktorantka wykazała wpływ obu typów stresu na ekspresję genu GnRH w strukturach podwzgórza i genu GnRH-R w podwzgórzu i w przysadce. O ile w okresie anestrus oba rodzaje stresu stymulowały ekspresję genów GnRH i GnRH-R we wszystkich badanych strukturach, to w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego tylko krótkotrwały stres wykazywał podobne działanie. Natomiast stres długotrwały hamował ekspresję obu genów w badanych strukturach, z wyjątkiem obszaru przedwzrokowego, w którym wykazano wzrost ekspresji GnRH-R. Doktorantka podaje, że najsilniejszy efekt działania stresora długotrwałego na ekspresję genu GnRH u owiec w okresie sezonowego anestrus stwierdzono w VM, natomiast

odczyt z rys. 4.2.1. wskazuje, że raczej w POA. W pracy przedstawiono obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR dla genów GnRH, z którego wynika, że w AP owiec, poddanych działaniu stresu pojawia się dodatkowy produkt, którym może być inna forma (I) GnRH. Doktorantka podaje, że produkt ten jest dłuższy o 20 par zasad, jednak nie pozwala na weryfikację, ponieważ nie umieszcza na elektroforogramie markerów masowych.

Doktorantka wykazała, że oś podwzgórze-przysadka-nadnercza, a dokładniej zmiany aktywności układu kortykoliberynergicznego wywierają istotny wpływ na aktywność transkrypcyjną genu GnRH i GnRH-R. Infuzja kortykoliberyny do III komory mózgu u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego powodowała obniżenie poziomu mRNA genu GnRH, natomiast infuzja agonisty CRH podwyższała poziom genu w POA i podwzgórzu. Natomiast wpływ CRH na poziom ekspresji genu receptora GnRH różnił się w poszczególnych strukturach obszaru podwzgórzowo-przysadkowego. Aktywacja receptorów CRH zwiększała poziom ekspresji genu GnRH-R w okolicy przedwzrokowej i obniżała w podwzgórzu i w przysadce. Zablokowanie receptorów wywoływało efekt przeciwny.

Ważną rolę w procesach reakcji organizmu na stres pełnią peptydy opioidowe. Doktorantka wykazała, że u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego dokomorowa infuzja β -endorfiny obniża istotnie poziom ekspresji genu GnRH w POA i w podwzgórzu, a infuzja antagonisty receptorów μ -opiodowych – naloksonu nie wpływa na poziom ekspresji genu w badanych strukturach. Ekspresja genu GnRH-R pod wpływem β -endorfiny uległa istotnemu podwyższeniu w POA i obniżeniu w VM i w przysadce, zaś w AH pozostała na poziomie zwierząt kontrolnych. β -endodrfina powodowała obniżenie stężenia LH w krwi oraz spadek częstotliwości i amplitudy pulsów. Nalokson nie wpływał w istotny sposób na poziom ekspresji GnRH-R w badanych strukturach, jak również nie powodował istotnych zmian w sekrecji LH.

Obejmujący 22 strony rozdział „Dyskusja”, zawiera interpretację uzyskanych wyników i pokazuje, że Doktorantka jest zorientowana w omawianej problematyce. Dyskusja jest prowadzona w podrozdziałach tematycznych i jest bardziej rozbudowana niż wstęp. Doktorantka poświęca sporo miejsca w „Dyskusji” roli układu GABA- i dopaminergicznego w regulacji aktywności układu gonadotropowego owiec w różnych okresach aktywności rozrodczej. Będąc pierwszym autorem prac dotyczących wpływu tych układów na ekspresję genów GnRH i GnRH-R w podwzgórzu i przysadce doskonale potrafi wpleść uzyskane wyniki w dyskusję nad wpływem stanu aktywności rozrodczej owcy na poziom ekspresji genu GnRH i jego receptora. Jednym z celów pracy było określenie współzależności między poziomami

ekspresji genu GnRH i genu receptora GnRH w układzie podwzgórzowo-porzysadkowym, a uwalnianiem GnRH/LH u owiec anestralnych, w fazie lutealnej i pęcherzykowej cyklu rujowego. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wskazują na istnienie takiej współzależności, jednak określenie tej współzależności mianem dodatniej korelacji uważam za niewłaściwe. Podobnie w podrozdziale dotyczącym wpływu czynników stresowych Doktorantka używa określenia brak jednorodnej dodatniej korelacji w sytuacji, gdy korelacja taka nie była badana. Można tu mówić o braku współzależności. Za bardzo ciekawą uważam dyskusję nad ekspresją GnRH-II. Poczynione w pracy obserwacje mogą stanowić wstęp do dalszych badań tego zagadnienia. W podrozdziale 5.5, omawiającym wpływ β -endorfiny na poziomy ekspresji genu GnRH i genu receptora GnRH Doktorantka pisze o połączeniach synaptycznych perykarionów neuronów β -endorfinergicznych z ciałami komórek GnRH. Czy w przypadku ciał komórkowych tych neuronów wykazano rzeczywiście kontakt synaptyczny?

Kolejny rozdział – „Wnioski” zawiera sześć punktów. Zawarta we wniosku numer 3 informacja o istnieniu współzależności między zmianą ekspresji genów GnRH i GnRH-R a zmianami stężenia LH u owiec powinna zostać przedstawiona jako oddzielny wniosek. Jest to ważny wniosek (wszak jednym z celów pracy doktorskiej było zbadanie istnienia tej współzależności) a w obecnej formie jest niejako ukryty.

UWAGI SZCZEGÓŁOWE

1. streszczenie – w miejsce określenia gen receptorowy właściwsze byłoby używanie określenia gen receptora,
2. str 15- Kaiser i wsp. 1997, która praca. Brak drugiego członu nazwiska cytowanej autorki (Sotowska-Brochocka),
3. str 16 – brak drugiego członu nazwiska cytowanej autorki (Sotowska-Brochocka),
4. str 18 – czy cytowana praca Okrasa i wsp., 1989 jest właściwa?
5. str 21 – zamiast lizoform powinno być izoform,
6. str 25 – zamiast enzymu przeprowadzającego degradację dopaminy powinno być enzymu kluczowego w syntezie dopaminy, która praca Anderson i wsp jest cytowana?
7. str 27 – zamiast cykli estralnych powinno być cykli estralnych,
8. str 31 - brak numeracji rozdziału „Założenia i cel pracy”,
9. str 33 - spis użytej aparatury oraz odczynników wykorzystanych w doświadczeniach powinien zostać umieszczony w końcowej części rozdziału, nie umieszczono zestawu Enhanced Avian HS RT-PCR

10. str 34 – zamiast kujawsko-pomorski powinno być kujawsko-pomorskim,
11. str 34 – zamiast dobrze zaaklimowane powinno być dobrze zaaklimatyzowane,
12. str 35 – brakuje informacji do czego porównywano wyniki uzyskane od owiec w fazie ciała żółtego,
13. str 37 – niezgodność odwołania do rysunku z numerem rysunku,
14. str 37 – w oficjalnej polskiej nomenklaturze anatomicznej nie funkcjonuje nazwa żyła jarzmowa, powinno być żyła szyjna zewnętrzna,
15. str 38 – błąd w pisowni seriami zamiast serjami,
16. str 38 – zamiast zmienności wewnątrz- i między seriami powinno być zmienność wewnątrz- i międzyseryjna,
17. str 39 – zamiast „pomiarów absorbcji” powinno być ‘pomiarów absorbancji’’,
18. str 40 – brak producenta zestawu Enhanced Avian HS RT-PCR,
19. str 43 – błąd w numeracji odniesienia do rysunku, powinno być Rys.3.5.,
20. str 44 – błąd w numeracji rysunku, powinno być Rys.3.5.,
21. str 45 - błąd w pisowni testu *post-hoc*,
22. str 47 – błąd w pisowni stalk median eminence, te informacje są już zawarte w spisie stosowanych skrótów, a istotność statystyczna różnic powinna zostać podana w opisie metod statystycznych,
23. rozdział „Wyniki” - brak konsekwencji w numeracji Rysunków. Np. rysunki w rozdziale 1 i 3 są numerowane wg zasady: numer rozdziału i kolejność rysunku, nawet, gdy są przedstawiane w podrozdziałach,
24. str 49 - podpis pod rys. 4.1.1. brak informacji na temat fazy cyklu rujowego owiec
25. str 52 – (A) w omówieniu wyników poziom istotności wynosi $**p \leq 0,01$ a na przypisanym mu rysunku *, co wg informacji zawartej na pierwszej stronie wyników oznacza $p \leq 0,05$,
26. str 52 – (B) w omówieniu wyników poziom istotności wynosi $***p \leq 0,01$ a na przypisanym mu rysunku **. W polskiej pisowni wyniki podajemy po przecinku a nie po kropce (podobnie przy innych rysunkach),
27. str 58 – opis do rys. 4.2.2.- brak odniesienia (A) w omówieniu wpływu stresu krótkotrwałego na wydzielanie LH oraz brak omówienia wpływu stresu długotrwałego na wydzielanie LH, które przedstawia Rys 4.2.2 (B),
28. str 64 – opis do rys 4.2.4. – brak odniesienia (A) i (B) przy omawianiu wyników,

29. str 69 – Tabela 4.1. nie podano pomiaru jakiego mRNA przedstawia tabela i u jakich owiec,
30. str 69 – brak omówienia zdjęcia i odniesienia w tekście,
31. str 92 – pisownia nazwiska Lewis 1994
32. str 101 – błąd w pisowni układu kortykoliberynergicznego,
33. str 104 – która praca Turzillo i wsp. jest tu cytowana?
34. str 109 – użycie określenia dodatnia korelacja uważam za niewłaściwe, ponieważ nie wykonywano testów określających tę korelację. Właściwiej byłoby użyć określenia - Istnienie współzależności między zmianami.....

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu "Oceny pracy" należy stwierdzić, że uzyskane wyniki wzbogacają naszą dotychczasową wiedzę o nowe informacje na temat procesów zaangażowanych w kontrolę aktywności układu gonadotropowego owiec na poziomie molekularnym. Przyczyniają się także do lepszego poznania mechanizmu działania stresu na biosyntezę i wydzielanie GnRH/LH u tego gatunku. W ocenianej pracy Doktorantka wykazała się opanowaniem szerokiego warsztatu badawczego, szczególnie w zakresie technik biologii molekularnej, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Należy szczególnie podkreślić, że większość wyników pracy doktorskiej została już opublikowana w specjalistycznych polskich (2) i międzynarodowych (3) czasopismach, umieszczonych na liście czasopism indeksowanych przez Filadelfijski Instytut Informacji Naukowej (Institute of Scientific Information). Doktorantka jest pierwszym autorem w 4 publikacjach i pierwszym współautorem w jednej publikacji. Zgodnie ze stanowiskiem Centralnej Komisji Do Spraw Stopni i Tytułów wcześniej opublikowane wyniki badań mogą być wykorzystane w rozprawie doktorskiej.

Przedstawione w recenzji uwagi i zapytania nie zmieniają pozytywnej oceny pracy, wskazują jedynie na pewne niedociągnięcia związane z procesem pisania pracy oraz stanowią głos w dyskusji nad wieloetapowym procesem centralnej regulacji funkcji rozrodczych w stanach fizjologicznych i w stanie stresu.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny praca mgr Magdaleny Olgi Ciechanowskiej pt. "Ekspresja genów GnRH i receptora GnRH w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy w różnych stanach fizjologicznych; wpływ czynników stresogennych" spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym **zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im Jana Kielanowskiego, PAN w Jabłonie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Magdaleny Olgi Ciechanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie pracy.**



Doc. dr hab. Janina Skipor