

Jabłonna 17.03.2009

Prof. dr hab. Jolanta Polkowska  
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt  
Im. Jana Kielanowskiego PAN  
O5-110 Jabłonna

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Andrzeja Hermana Pt. „Wpływ stresu immunologicznego i interleukiny-1 $\beta$  na układ podwzgórzowo-przysadkowo-gonadotropowy u anestralnych owiec” wykonanej w Zakładzie Neuroendokrynologii Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie pod kierunkiem doc. dr hab. Doroty Tomaszewskiej-Zaremby.

Problem naukowego wyjaśnienia wzajemnych powiązań pomiędzy układem immunologicznym a rozrodem u zwierząt został podjęty w badaniach światowych stosunkowo niedawno. Zależności te nie są poznane zbyt dobrze i dotyczą niewielu gatunków, głównie szczura. Szczególnie ważnym pytaniem w tych badaniach jest uzyskanie odpowiedzi jaki jest mechanizm działania stresu immunologicznego na układ neuroendokryny odpowiedzialny za procesy rozrodcze i jakie endogenne związki biorą w nich udział. Autor przedstawionej do recenzji pracy podjął się zadania mającego na celu wyjaśnienie wpływu i mechanizmu działania endotoksyny podanej do obwodowo na układ neuralny GnRH podwzgórza i na hormony gonadotropowe przysadki mózgowej u samicy owcy w okresie fizjologicznego anestrus.

Badania były prowadzone w przeważającej większości na poziomie molekularnym i dotyczyły ekspresji genów najważniejszych hormonów i ich receptorów, biorących udział w regulacji rozrodu w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i w przysadce mózgowej oraz peptydów i ich receptorów związanych z funkcjami immunologicznymi

na obszarze OUN. Aktywność hormonów badana była również, chociaż w mniejszym stopniu, na poziomie komórkowym i ustrojowym. Autor zaprezentował olbrzymią ilość analiz wykonanych metodami biologii molekularnej i metodą radioimmunologiczną. Uzyskana w efekcie bardzo szeroka gama wyników została przeanalizowana i zinterpretowana w aspekcie fizjologicznym. Autor wnioskował o mechanizmach, biorących udział w procesie hamowania syntezy i uwalniania hormonów układu podwzgórzowo-przysadkowo-gonadotropowego przez czynniki stresu immunologicznego, ze szczególnym uwzględnieniem komunikacji pomiędzy tymi dwoma układami.

Tak więc wybór tematu podjętego w niniejszej rozprawie doktorskiej jest nowatorski w skali światowej i ściśle związany z tematyką prac prowadzonych w IFZZ PAN nad regulacją rozrodu. Aby zrealizować to zadanie autor podjął ogromną pracę nad opracowaniem, adaptacją i unowocześnieniem metod z zakresu biologii molekularnej, w celu oznaczenia ekspresji mRNA takich peptydów i hormonów jak GnRH, LH, FSH, prolaktyna, interleukina-1 $\beta$ , czynnik martwicy guza  $\alpha$  a także różnych form receptorów tych związków.

Praca liczy 174 strony i jest podzielona na typowe i we właściwych proporcjach utrzymane rozdziały: wykaz stosowanych skrótów- 2 str.; wstęp- 34 str.; cel pracy - 1 strona; materiały i metody (w tym 33 tabele) -35 str.; wyniki przedstawione na 99 rys.- 39 str.; dyskusja- 23 str.; podsumowanie wyników i wnioski- 2 str.; streszczenie polskie i angielskie 6 str.; spis literatury obejmujący 346 pozycji (prawie wyłącznie anglojęzycznych i w przeważającej większości z ostatniego dziesięciolecia)- 30 str.; spis rysunków i tabel - 5 stron.

We wstępie uzasadniającym cel podjętych badań doktorant na początku zapoznał nas z dotychczasowym stanem wiedzy związanej z relacjami pomiędzy układem immunologicznym a rozrodczym. Ponieważ literatura dotycząca tego zagadnienia jest bardzo skąpa, autor, na podstawie nielicznych przesłanek pochodzących z badań na szczurze postawił hipotezę, że stres immunologiczny wywoływany przez

lipopolisacharyd (LPS) może działać na poziomie OUN na układ neuralny GnRH poprzez cytokinę IL-1 $\beta$ .

W dalszym podrozdziale wstępu nazwanym „częścią teoretyczną” autor w sposób wyczerpujący chociaż być może zbyt drobiazgowy, bo odbiegający czasem od głównego tematu, zaprezentował stan wiedzy dotyczący budowy i właściwości związków i ich receptorów, które mogłyby brać udział we wspomnianych powyżej procesach (LPS, IL-1 $\beta$ , TNF). Każdy z tych podrozdziałów mógłby stanowić nowoczesną pracę przeglądową, tym bardziej że autor cytuje najnowsze badania z ostatnich lat, pochodzące również z macierzystego Instytutu. Następne akapity poświęcone są budowie i roli narządów takich jak bariera krew-mózg, podwzgórze i przysadka a także regulacji sekrecji hormonów podwzgorzowych i przysadkowych, które były obiektem badań w przedstawionej dysertacji. Ta część jest merytorycznie poprawna, uwzględnia najnowsze badania i świadczy o dobrej znajomości opisywanych zagadnień.

W rozdziale „Cel pracy” autor przedstawił hipotezę badawczą, uzasadnił cel podjętych badań i wyszczególnił 5 zadań badawczych. Są one sformułowane jasno i precyzyjnie. Jednakże pominięto tu opis zadania związanego z określeniem wpływu LPS i IL-1 $\beta$  na uwalnianie hormonów gonadotropowych, którego wykładnikiem jest pomiar stężenia tych hormonów w plazmie krwi obwodowej. Takie zadanie zostało wykonane i omówione w dalszej części pracy.

Rozdział „Materiały i metody” został opisany perfekcyjnie: wyczerpująco, szczegółowo i klarownie. Dobrym pomysłem było przedstawienie poszczególnych procedur w formie tabel. Do realizacji założonych badań doktorant użył przede wszystkim metod biologii molekularnej, które dostarczają wiadomości o tym jak w komórce przebiegają procesy transkrypcji i translacji. Nie jestem specjalistą z zakresu tych metod, jednakże chciałabym odnieść się pozytywnie do imponująco szerokiego zakresu pracy jakie doktorant włożył w ich opracowanie. Począwszy od zaprojektowania sekwencji starterów dla 15-stu genów, a skończywszy na wykonaniu analiz ekspresji badanych genów a także analizy translacji GnRH i IL-1 $\beta$ . Trzeba w tym

miejszu nadmienić, że badania nad transkrypcją GnRH u owcy w literaturze światowej są rzadkością. Jak do tej pory nie udało się stworzyć sondy genetycznej dla tego peptydu u tego gatunku, do badań metodą hybrydyzacji *in situ*. Dlatego też, w przeciwieństwie do innych gatunków niewiele wiadomo jest na temat procesów transkrypcji i translacji GnRH u owcy. Tym bardziej należy docenić wkład autora recenzowanej pracy w rozwinięcie techniki umożliwiającej „posunięcie do przodu” badań tych procesów.

Ilość uzyskanych przez doktoranta wyników jest bardzo duża. Zostały one przedstawione na przejrzystych i precyzyjnie wykonanych rysunkach o bardzo ładnej kolorystyce. Opis wyników i podpisów pod rysunkami jest bez zarzutu. Ten sposób przedstawienia wyników pozwolił na prześledzenie zmian zachodzących w aktywności badanych transkryptów w różnych częściach podwzgórza i w przysadce po podaniu obwodowym LPS i centralnym IL-1 $\beta$  u samicy owcy.

W pracy wykazano, że podanie LPS do obwodowo wywołuje w organizmie owcy stan stresu objawiający się podwyższonym uwalnianiem hormonów przyjętych za wskaźniki stresu (kortyzol i prolaktyna). W tych warunkach zaobserwowano generalnie obniżenie ekspresji messenger RNA GnRH i jego receptora w ośrodkach podwzgórza, mRNA LH $\beta$  i jego receptora w przysadce oraz spadek uwalniania LH do krwi obwodowej, z jednoczesnym wzrostem aktywności ekspresji genów dla badanych cytokin i ich receptorów w podwzgórzu i przysadce. Wzrastał również poziom IL-1 $\beta$  w płynie mózgowo-rdzeniowym. Centralne podanie IL-1 $\beta$  powodowało przede wszystkim obniżenie translacji GnRH, jak również obniżenie ekspresji dla genu GnRH w ośrodkach neuralnych gdzie hormon jest syntetyzowany i uwalniany, oraz dla genu LH $\beta$ , jednak bez wpływu na uwalnianie hormonów gonadotropowych.

Na podstawie tych wyników autor wysunął 4 poprawne i oryginalne wnioski, które stanowią o wysokiej wartości naukowej pracy. Wyjaśniają one w dużym stopniu mechanizm działania stresu immunologicznego na układ rozrodczy

owcy w OUN i w przysadce, na poziomie transkrypcji i translacji genów hormonów i cytokin prozapalnych produkowanych w tych narządach.

Trzeba tu jednak zaznaczyć, że wnioski te nie popierają w sposób jednoznaczny hipotezy roboczej a mianowicie, że stres immunologiczny wywołany przez LPS na poziomie obwodu hamuje sekrecję hormonów układu gonadotropowego poprzez IL-1beta pochodzenia centralnego. Pierwszy wniosek sugeruje, że w procesie tym biorą udział także inne cytokiny prozapalne oraz samo LPS.

W dyskusji autor przeprowadził szczegółową interpretację uzyskanych wyników na podstawie najnowszych danych z literatury światowej. Trzeba przyznać że liczba cytowanych prac jest imponująca (ponad 300 pozycji) i świadczy to o tym, że autor dogłębnie zapoznał się z tematem aby zinterpretować uzyskane wyniki.

Przeprowadzenie dyskusji nie było zadaniem łatwym tym bardziej, że w wielu przypadkach brak było danych literaturowych odnoszących się do omawianego problemu. Zapewne dlatego w rozdziale tym jest zbyt dużo spekulacji nie popartych danymi z literatury. Dotyczy to m. i. interpretacji wyników związanych z działaniem centralnej IL-1 $\beta$ . Natomiast bardzo dogłębnie i logicznie wyjaśnione jest zjawisko występowania transkryptu GnRH w zakończeniach nerwowych, co jest nowością na skalę światową. W tym przypadku autor dał sobie doskonale radę z wyjaśnieniem tego zjawiska opierając się na wynikach prac wykonanych na innych typach neuronów.

Autor ma również krytyczne podejście do niektórych wyników, co wynika z zastosowania tylko jednej metody RT-PCR. Dotyczy to np. receptora prolaktyny.

Uważa on słusznie, że metoda ta, ze względu na sposób przygotowania tkanki do analiz nie jest dość precyzyjna dla dokonania analizy tego związku.

Jednym z zarzutów dotyczącym tej części pracy jest moim zdaniem brak porównania pomiędzy efektem działania LPS podanej obwodowo a IL-1 $\beta$  podanej centralnie.

Wypunktowanie podobieństw i różnic w ich działaniu pomogłoby w bardziej precyzyjnym zweryfikowaniu hipotezy roboczej. Drugi zarzut dotyczy uszeregowania kolejności w opisie badanych zjawisk. Uwalnianie hormonów gonadotropowych autor

omawia na samym początku, chociaż jest to końcowy wynik całej kaskady zdarzeń, którego początkiem jest ekspresja genu GnRH.

Reasumując, praca dostarcza nowych, nie znanych do tej pory danych o mechanizmach wyjaśniających wpływ układu immunologicznego na układ rozrodczy u owcy. Autor rozprawy wykonał w pełni postawione cele badawcze stosując właściwe metody z zakresu biologii molekularnej i radioimmunologii. Wartość wyników jest wysoka i na pewno autor ma szansę opublikować je w czasopiśmie o dobrej renomie naukowej.

Wniosek końcowy: Po szczegółowej analizie omawianej pracy mgr Andrzeja Hermana Pt. „Wpływ stresu immunologicznego i interleukiny-1 $\beta$  na układ podwzgórzowo-przysadkowo-gonadotropowy u anestralnych owiec” stwierdzam, że praca ta spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim określone w ustawie o tytule i stopniach naukowych z dn. 14go marca 2003r (Dz. U. nr 65 poz. 595) wraz ze zmianami wprowadzonymi ustawą z dn. 27 lipca 2005 (Dz. U. nr 164, poz. 1365). Przedkładam Wysokiej Radzie Instytutu Fizjologii Żywienia Zwierząt im Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie wniosek o przyjęcie rozprawy jako dysertacji doktorskiej i dopuszczenie mgr Andrzeja Hermana do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na duże walory poznawcze pracy i nowatorski sposób jej wykonania proponuję o przyjęcie pracy z wyróżnieniem.

Prof. dr hab. Jolanta Polkowska

