Dr hab. n. med. Elżbieta Wasilewska – Dziubińska prof. nadzw. w CMKP,

Zakład Neuroendokrynologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa 01-813, ul. Marymoncka 99/103

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

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Karoliny Haziak pt.: "Lipopolisacharyd jako bezpośredni modulator aktywności układu podwzgórzowo-przysadkowo-gonadotropowego u owcy – badania *in vivo* oraz *in vitro* " została opracowana w formie manuskryptu (Jabłonna 2014r.), w skład którego wchodzą kopie publikacji, których Doktorantka jest pierwszym autorem:

1. Haziak K., Herman A.P., Tomaszewska-Zaremba D., 2013. „The effect of LPS on LH release and gene expression of *LH-β, GnRH-R* and *TLR4* in the anterior pituitary of follicular phase ewes – an *in vitro* study„. Journal of Animal and Feed Sciences, vol. 22, no. 2, 97 – 105. (IF – 0,757)
2. Haziak K., Herman A.P., Tomaszewska-Zaremba D., 2014. „Effects of central injection of anti-LPS antibody and blockade of TLR45 on GnRH/LH secretion During immunological stress in anestrous ewes" Mediators of Inflammation, vol. 2014, Article ID 867170, 10 pages, 2014. doi: 10.1155/ 2014/867170. (IF – 3,882), których Doktorantka jest pierwszym autorem.

W wyżej wymienionych publikacjach indywidualny wkład pracy mgr Karoliny Haziak jako pierwszego autora dotyczył współudziału w opracowaniu koncepcji, celu i metodyki badań, w przeprowadzeniu doświadczeń, wykonaniu analiz laboratoryjnych i statystycznych, współudziału w analizie i interpretacji wyników, oraz współudziału w przygotowaniu publikacji do druku. Pozostali współautorzy wyrazili zgodę aby wyżej wymienione publikacje zostały

wykorzystane przez mgr Karolinę Haziak do przygotowania ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Karoliny Haziak wraz z piśmiennictwem liczy 45 stron, bez wliczenia kopii publikacji wchodzących w skład manuskryptu i jest starannie zredagowana, przejrzysta, napisana poprawnym, ładnym językiem, z prawidłowym zastosowaniem nazewnictwa naukowego. Piśmiennictwo liczące 75 pozycji, zostało starannie wyselekcjonowane i prawidłowo zacytowane. Poruszana przez Doktorantkę tematyka dotycząca oddziaływania pomiędzy układem immunologicznym i rozrodczym ze szczególnym uwzględnieniem procesów zachodzących na poziomie molekularnym w podwzgórzu i przysadce, wpisuje się w niezwykle ważny nurt badań nad przyczynami coraz powszechniej występujących zaburzeń procesów rozrodczych. Wiadomo jest, że jedną z przyczyn zaburzeń procesów rozrodczych zarówno u ludzi jak i u zwierząt jest utrzymujący się w organizmie spowodowany przez infekcje bakteryjne i wirusowe stan zapalny, który wpływa na aktywność osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej (HPG) i na tej drodze może prowadzić do zaburzeń procesów rozrodczych. We wstępie mgr Karolina Haziak dokonuje przeglądu piśmiennictwa dotyczącego badań nad hamującym wpływem stresu immunologicznego na układ rozrodczy. W pierwszej kolejności mgr Karolina Haziak powołuje się na prace, w których wykazano, że stres immunologiczny hamuje sekrecję gonadoliberyny (GnRH), oraz hormonu luteinizującego (LH) -w tym również na prace wykonane wcześniej w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, a następnie w sposób rzeczowy przedstawia szczegółowe dane z piśmiennictwa dotyczące działania GnRH - kluczowego neurohormonu w regulacji układu HPG .W kolejnej części wstępu Doktorantka koncentruje się na piśmiennictwie dokumentującym mechanizm komórkowego oddziaływania endotoksyny bakteryjnej - lipopolisacharydu (LPS), ponieważ LPS jest powszechnie używany w układach doświadczalnych do wywołania stresu immunologicznego. LPS działa na organizm poprzez swoisty receptor - Toll-

podobny receptor 4 (TLR4), którego jest egzogennym ligandem. W oparciu o piśmiennictwo mgr Karolina Haziak w sposób wyczerpujący omawia mechanizm hamującego oddziaływania stresu immunologicznego, spowodowanego podaniem LPS na aktywność osi HPG. Może to być działanie za pośrednictwem mediatorów prozapalnych, jak również prostaglandyn, może to być działanie bezpośrednie LPS na komórki docelowe przez receptor TLR4. Wykazanie obecności TLR4 w podwzgórzu może wskazywać na możliwość hamowania osi HPG przez endotoksyny na poziomie ośrodkowego układu nerwowego. Doktorantka zwraca uwagę na to, że w dostępnym piśmiennictwie opisanych jest wiele fragmentarycznych, często kontrowersyjnych mechanizmów pośredniczących w hamującym działaniu LPS na procesy rozrodcze, dlatego też podejmuje próbę kompleksowego rozwiązania tego trudnego zagadnienia.

Celem pracy doktorskiej było zweryfikowanie hipotezy badawczej zakładającej, że LPS podany obwodowo działa bezpośrednio poprzez receptor TLR4 na poziomie podwzgórza i przysadki hamując aktywność osi HPG u dorosłych maciorek owcy.

Zgodnie z zaplanowanymi zadaniami badawczymi wyznaczony cel był realizowany dwuetapowo w przeprowadzonych doświadczeniach *in vitro* i *in vivo.*

W rozdziale dotyczącym materiałów i metod mgr Karolina Haziak szczegółowo charakteryzuje zwierzęta doświadczalne oraz zastosowane metodyki *in vitro* i *in vivo,* które szczegółowo również były opisane w publikacjach Doktorantki. Należy podkreślić, że do doświadczeń *in vitro* używano fragmentów przysadki (eksplantów), co zapewniało zachowanie całych wyizolowanych struktur tkankowych do badań. Wybór metod oraz konstrukcja układów doświadczalnych świadczą o znajomości przez mgr Karolinę Haziak zagadnień związanych z fizjologią układu rozrodczego owcy, a także o dużej pomysłowości i cierpliwości w wykonywaniu długotrwałych i precyzyjnych doświadczeń.

Celem przeprowadzenia doświadczeń *in vitro* było określenie wpływu LPS na sekrecję LH na poziomie przysadki mózgowej. Zbadano wpływ LPS na uwalnianie LH z eksplantów przedniego płata przysadki mózgowej, oraz na ekspresję genów: LHβ, GnRH-R i TLR4 w eksplantach pobranych od owiec wcześniej wprowadzonych w stres immunologiczny (podanie dożylne LPS). oraz owiec kontrolnych (podanie dożylne soli fizjologicznej).

Celem przeprowadzenie doświadczeń *in vivo* było zbadanie zmian sekrecji GnRH/LH u owiec po centralnym podaniu (infuzja do III komory mózgowej) przeciwciał anti-LPS lub po zablokowaniu receptora TLR4 podczas stresu immunologicznego wywołanego obwodowym podaniem LPS . Określono wpływ LPS podanego *iv* przeciwciała anti-LPS oraz przeciwciał wiążących komponenty receptora TLR4 (anti-LMP i anti-MD-p22) podanych dokomorowo na: uwalnianie LH i kortyzolu do krwi obwodowej, ekspresję genów LHβ, GnRH-R i TLR4 w przedniej części przysadki mózgowej, ekspresję genów GnRH, GnRH-R i TLR4 w wybranych strukturach podwzgórza (POA, AHA, MBH, ME).

Wyniki doświadczeń zostały przedstawione w publikacjach będących częścią manuskryptu rozprawy doktorskiej.

W podsumowaniu badań *in vitro* mgr Karolina Haziak wykazała, że otrzymane wyniki wskazują, że endotoksyna bakteryjna jest bezpośrednim modulatorem sekrecji LH z przysadki, zarówno wpływając na jego uwalnianie jak i na transkrypcję jego genu. Bezpośrednie działanie endotoksyny bakteryjnej na przysadkę może być jednym z mechanizmów, poprzez które stres immunologiczny oddziałuje na procesy rozrodu. W podsumowaniu badań *in vivo* Mgr Karolina Haziak wykazała, że zablokowanie receptora TLR4 w podwzgórzu przywróciło do poziomu kontrolnego, obniżoną obwodowym podaniem LPS, ekspresję genu LH-β w przysadce, ale nie było wystarczające do odblokowania uwalniania LH, co może sugerować, że stan zapalny hamuje uwalnianie tego hormonu na poziomie przysadki.

We wnioskach mgr Karolina Haziak stwierdziła, że na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że: 1. LPS moduluje sekrecję LH z przysadki, ale jego wpływ może zależeć od stanu fizjologicznego/statusu immunologicznego zwierzęcia. 2. Receptor TLR4 częściowo uczestniczy w mechanizmie hamowania sekrecji GnRH/LH w czasie stresu immunologicznego na poziomie OUN. Ligand receptora TLR4 - LPS jest zaangażowany w hamowanie aktywności układu podwzgórzowo-przysadkowo-gonadotropowego u owcy.

Wnioski które przedstawiła Doktorantka na zakończenie pracy odpowiadają założeniom pracy i stanowią odpowiedź na pytania zawarte w celu pracy. Są niezmiernie wartościowe z punktu widzenia naukowego i dotyczą również medycyny ludzkiej i weterynaryjnej.

Praca jest oryginalnym osiągnięciem Doktorantki pracującej pod kierunkiem dr hab. Doroty Tomaszewskiej –Zaremby przy współudziale dr Andrzeja Hermana.

Stwierdzam, że rozprawa mgr Karoliny Haziak spełnia wszystkie kryteria i warunki stawiane przed rozprawami na stopień doktora nauk rolniczych.

Należy podkreślić, że wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie uzyskały już wcześniej niezależnie od aktualne przedstawionej przeze mnie opinii - bardzo dobrą ocenę recenzentów pism, na łamach których zostały opublikowane.

Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN o dopuszczenie mgr Karoliny Haziak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na oryginalny charakter już opublikowanych uzyskanych wyników badań zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Haziak z wyróżnieniem.

Elżbieta Wasilewska-Dziubińska