



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

Dr hab. Janina Skipor, profesor nadzwyczajny

Zakład Lokalnych Regulacji Fizjologicznych

IRZiBŻ PAN w Olsztynie

Olsztyn, 31 maja 2015

RECENZJA

PRACY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. MAGDALENY CIEŚLAK

pt.

” Stresogenny wpływ wczesnego przerywania odchowu przy matce na wydzielanie hormonów gonadotropowych w trakcie rozwoju jagniąt”

wykonanej w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie pod kierunkiem dr hab. Marty Wańkowskiej, prof. nadzwyczajnego

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie podjęty w dniu 24 czerwca 2014 roku, zgodnie z wymaganiami art. 20 ust. 5 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r, Nr 65, poz. 595, z póź, zm.) .

Przedstawiona do recenzji praca doktorska przedstawia wyniki badań nad wpływem wczesnego przerywania odchowu jagniąt przy matce na hormonalne mechanizmy odpowiedzialne za proces dojrzewania gonad u samców i samic i jest, w pewnym stopniu, kontynuacją prowadzonych w Instytucie badań. Warto w tym miejscu podkreślić istotny wkład Promotora ocenianej rozprawy w badania nad mechanizmem postnatalnego wzrostu somatycznego i rozwoju płciowego u jagniąt oraz nad wpływem zerwania więzi psychoemocjonalnej i fizjologicznej pomiędzy potomstwem a matką na wydzielanie hormonów odpowiedzialnych za rozwój osobniczy u owiec. W wielu krajach użytkowanie mleczne owiec

jest ważną gałęzią produkcji rolnej a hodowcy stosują różne systemy odsadzania jagniąt. Wiek, w którym odsadzane są jagnięta jest bardzo zróżnicowany, począwszy od 14 dni po urodzeniu do naturalnego odsadzenia w wieku około 3-4 miesiąca. Z uwagi na fakt, że odsadzenie oznaczające usunięcie z diety jagnięcia mleka matki zbiega się, chociaż nie zawsze, z oddzieleniem jagniąt od ich matek, podjęty przez Doktorantkę temat uważam za bardzo istotny nie tylko z poznawczego punktu widzenia. W dostępnym piśmiennictwie brakuje prac na temat wpływu wczesnego przerwania odchowu przy matce na wydzielanie hormonów gonadotropowych u jagniąt, które uwzględniałyby różnice między płciami. Dotychczasowe badania koncentrowały się głównie na wpływie przerwania odchowu jagniąt przy matce na dobrostan zwierząt i dotyczyły krótkotrwałego wpływu wczesnego, stopniowego czy nagłego sposobu odsadzania jagniąt na wybrane parametry fizjologiczne i zachowanie się jagniąt.

Oceniana rozprawa, licząca 85 stron, została napisana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami dla rozpraw naukowych. Zawiera kartę tytułową, oświadczenie Promotora i Autora pracy, objaśnienie stosowanych skrótów, spis treści oraz następujące rozdziały: Wstęp (8 stron), Cel badań, Materiał i metody (7 stron), Wyniki (21 stron), Dyskusja (15 stron), Podsumowanie, Wnioski, Bibliografia (146 pozycji piśmiennictwa), Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Spis rycin (11) i tabel (2). Formalna strona pracy nie budzi zastrzeżeń.

We **Wstępie** Doktorantka przedstawiła, w syntetyczny sposób, zagadnienie ontogenezy oraz zasady podziału etapu postnatalnej ontogenezy na fazę noworodkową, przejściową (infantylną) i rozwoju płciowego (juwenilną). Następnie wyjaśniła jaki wpływ wywiera zerwanie więzi psychoemocjonalnej i fizjologicznej między potomstwem a matką na wydzielanie hormonów osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, podkreślając potrzebę zbadania zróżnicowania płciowego reakcji stresowej tak krótkotrwałej, jak i długotrwałej na przerwaniu odchowu przy matce. W dalszej części Autorka opisała mechanizmy regulacji wydzielania LH i FSH w przebiegu ontogenezy u owcy, zarówno u samic, jak i samców. Omówiła również wpływ przerwania odchowu przy matce pod koniec fazy infantylniej na syntezę, akumulację i uwalnianie hormonów gonadotropowych u samic owiec oraz u samic i samców szczura. W tym miejscu zabrakło wyjaśnienia jaki termin przerwania odchowu przy matce uznaje się za wczesny w odniesieniu do jagniąt. Niektóre źródła podają, że zwykle termin przed 90 dniem życia jest uznawany za wczesny ale też mówi się, że wczesny jest termin 60 dni. Należałoby to sprecyzować w oparciu o dane z literatury. W dalszej części Doktorantka wskazała na brak w literaturze prac dotyczących wydzielania hormonów gonadotropowych u jagniąt oddzielonych od matki w trakcie rozwoju po fazie neonatalnej do rozpoczęcia dojrzewania płciowego, które uwzględniałyby różnice między płciami. W rozdziale tym zawarto wszystkie niezbędne

informację, przesłanki i sugestie, z których wynikają zaplanowane cele badań. Nie zadbane jednak o czytelnika. Długie akapity (tylko 4 w 8 stronicowym tekście) potrafią zniechęcić do czytania, nawet w sytuacji gdy treść jest ciekawa.

Rozdział zatytułowany **Cel badań** zawiera uzasadnienie podjęcia badań wraz z hipotezą badawczą, która zakłada, że odsadzenie na początku 6 tygodni życia ma długotrwały hamujący wpływ na wydzielanie hormonów gonadotropowych i zmienia uwalnianie testosteronu i kortyzolu u jagniąt oraz że wpływ ten jest zróżnicowany płciowo. Dodatkowo postanowiono sprawdzić kiedy w czasie postnatalnego rozwoju płciowego zaznacza się stresogenny wpływ wczesnego przerwania odchowu przy matce na wydzielanie LH i FSH na poziomie komórek w przysadce mózgowej u samic.

Przeprowadzenie zaplanowanych badań wymagało od Autorki opanowania wielu technik analitycznych, między innymi: metody RIA oznaczania stężenia hormonów steroidowych (kortyzol, testosteron) oraz hormonów białkowych (LH i FSH), metody hybrydyzacji *in situ*, metody immunohistochemicznej, jak również analiz statystycznych. Jest to niewątpliwie wielką zaletą przemawiającą za bogatym warształem analitycznym Doktorantki. Nie mniej uważam, że w rozdziale **Material i metody** Autorka dokonała zbyt skrótowego opisu stosowanych metod. Forma ta byłaby do przyjęcia w przypadku rozpraw napisanych zgodnie z nowymi wytycznymi (krótki opis oraz dołączone publikacje), gdyż w rozprawach opartych na opublikowanych pracach, metodyka jest już poddana ocenie przez recenzentów wydawniczych. Natomiast w monografii brak precyzji i zbyt lakoniczny opis niektórych elementów metodyki jest znacznym niedociągnięciem. Dlatego opis ten powinien być uzupełniony o brakujące informacje podczas prezentacji, a niefortunnie użyte określenia powinny być usunięte.

W podrozdziale 3.1 (Układ doświadczalny) Autorka podaje, że podział na grupy wiekowe (Tabela 1) cyt. „pozostaje w zgodzie z podziałem postnatalnego rozwoju na fazy, infanrylną (do 9 tygodni) i rozpoczęciem juwenilnej (po 9 tygodniach)”. We wstępie do pracy dokonano innego podziału, lokalizując fazę infanrylną w okresie od 3 do 12 tygodnia. Skoro na czas trwania danej fazy ma wpływ genotyp oraz czynniki wewnętrzne i zewnętrzne działające na model badawczy, co Doktorantka podaje we wstępie, to należy to w tym miejscu wyjaśnić (materiały i metody) lub opisać nieco szerzej we wstępie.

W podrozdziale 3.2 (Pobieranie i wstępna obróbka materiału) nie podano jaką objętość krwi pobierano jednorazowo, co jest ważne z uwagi na częstotliwość pobierania krwi oraz wiek i masę ciała jagniąt. Niezrozumiała jest przedstawiona kolejność zdarzeń: po pobraniu krwi dysekcja przysadki a potem dekapitacja? Czy nie powinno być następującej kolejności: uśmiercenie, dekapitacja, utrwalenie perfuzyjne materiału *in situ* i dopiero wtedy dysekcja i

dalsze utrwalanie materiału? Czy utrwalenie *in situ* wykonano perfuzyjnie, poprzez podanie dotętnicze roztworu utrwalającego (jakiego)? Jaka była objętość tego roztworu? Czy wcześniej podano dotętniczo również czynnik rozkurczający naczynia krwionośne? W opisie metody zabrakło też ważnych szczegółów, mianowicie czasu i temperatury dalszego utrwalania, procedury odwadniania tkanek i zatapiania w parafinie.

W podrozdziale 3.3 (Oznaczenia hybrydohistochemiczne) nie podano informacji o czasie inkubacji z przeciwciałem anti-DIG oraz miana przeciwciał. Dobrze jest podać w jakim celu robiono te analizy – określenia poziomu syntezy gonadotropin w komórkach.

W podrozdziale 3.4 (Oznaczenia immunohistochemiczne) pominięto w opisie metody etap blokowania, bardzo istotne informacje o mianie użytych przeciwciał pierwszych i drugich, nie podano czasu inkubacji i temperatury inkubacji. Brak tych informacji nie pozwala na weryfikację zastosowanej metody. Dobrze jest podać w jakim celu robiono te analizy – określenia poziomu akumulacji gonadotropin w komórkach.

W podrozdziale 3.5, w bardzo krótkim opisie metody oznaczania kortyzolu, LH i FSH pojawiły się nieodpowiednie sformułowania. Kortyzol jest hormonem steroidowym i niezależnie od gatunku ma tę samą strukturę chemiczną, dlatego niewłaściwe jest użycie „...przy użyciu przeciwciał produkowanych na króliku przeciw owczemu kortyzolowi”. Nieodpowiednie jest też określenie, że w przypadku oznaczeń LH stosowano owczą surowicę anti-LH a w przypadku oznaczeń FSH użyto owczej surowicy anti-FSH. W związku z powyższym nasuwa się pytanie czy Doktorantka sama wykonywała oznaczenia stężenia hormonów czy dostała już gotowe wyniki?

W rozdziale **Wyniki** Doktorantka przedstawia, w oddzielnych podrozdziałach, wpływ wczesnego oddzielenia od matki na parametry związane z wydzielaniem kortyzolu (stężenie średnie, podstawowe, amplituda i częstotliwość pulsów), syntezą i akumulacją LH i FSH w komórkach gonadotropowych oraz wydzielaniem LH i FSH u przedstawicieli obojga płci oraz na stężenie testosteronu i średnią masę jąder u samców. Wyniki przedstawiono na 11 rycinach opatrzonych wystarczającym komentarzem. Pragnę podkreślić, że o ile do formy przedstawienia wyników mam pewne uwagi, to wyniki pracy uznaję za wartościowe.

W związku z brakiem informacji, w opracowaniu statystycznym wyników, o transformacji wyników przyjmuję, że wyniki przedstawione w procentach (Ryc. 4, 5, 8) były analizowane statystycznie jako wyniki oryginalne, nietransformowane. W przypadku niektórych czasopism naukowych może to stanowić problem, ponieważ czasopisma te nie akceptują takiej analizy. W opisie wyników analizy HHC i IHC pojawia się wyrażenie „różnica’ w zdaniu cyt. ”Ta różnica była większa u samców niż u samic ($P < 0.001$ versus $P < 0.01$; Ryc. 4)”, czy nie lepiej byłoby je

zastąpić wyrażeniem „poziom istotności”. Różny poziom istotności uzyskany w analizie może wskazywać, że wartości te były różne u samców i u samic. Autorka, w podpisie pod niektórymi rycinami podaje, że ta sama litera (a, b, c, d, e) wskazuje na różnicę ($P < 0,05$) między płciami. Jest to zrozumiałe w sytuacji, gdy oznaczenie pojawia się nad słupkiem. Do czego odnosi się litera nad klamrą? Recenzent odczytuje to, że porównano „różnicę” między grupą kontrolną i eksperymentalną dla obu płci. Jeżeli przeprowadzono taką analizę to należy odnieść się do niej w opracowaniu statystycznym wyników.

Na podstawie obecności pęcherzyków jajnikowych o średnicy mniejszej niż 6-7 mm oraz braku obecności ciałek żółtych wykluczono rozpoczęcie dojrzewania u samic w badanym okresie. Na jakiej podstawie przyjęto to kryterium?

Obejmujący 15 stron rozdział **Dyskusja**, prowadzona w 2 podrozdziałach tematycznych, zawiera interpretację uzyskanych wyników i pokazuje, że Doktorantka jest dobrze zorientowana w omawianej problematyce. Nieliczne uchybienia zostały wykazane w uwagach szczegółowych.

Rozprawę kończy **Podsumowanie**, które wydaje się być dobrym sposobem aby w logicznej i przejrzystej formie dokonać syntetycznego podsumowania wyników przeprowadzonych doświadczeń. Należy jednak sprawdzić czy poprawne jest zdanie, że zwiększeniu wydzielania LH u samic w fazie infantylnej towarzyszy zmniejszenie wydzielania FSH, podczas gdy akumulacja LH zwiększa się a akumulacja FSH zmniejsza się w 9 tygodniu. Dane wskazują, że ma miejsce raczej spadek akumulacji LH i wzrost akumulacji FSH.

Kolejny rozdział zawiera **wnioski** przedstawione w pięciu punktach. Zdaniem Recenzenta można pominąć wniosek 1. ponieważ te same informacje są zawarte we wniosku numer 5, który jest właściwszy ponieważ odnosi się do postawionej hipotezy i powinien być podany w pierwszej kolejności. Z uwagi na fakt, że jako celu pracy nie podano zweryfikowanie hipotezy o roli FSH w hormonalnej regulacji, w tym wniosku (obecnie jest to 5. wniosek) właściwsze byłoby sformułowanie, że wyniki wskazują, że FSH jest ważnym elementem hormonalnej regulacji dla przełomowego etapu rozwoju płciowego. Wniosek numer 2 jest raczej podsumowaniem wyników i jako taki powinien być usunięty. W trzecim wniosku podano, że wydzielanie LH i FSH na poziomie komórek w przysadce mózgowej pod stresogennym wpływem przerwania odchowu przy matce jest zróżnicowane płciowo już w fazie infantylnej. Co skłoniło Doktorantkę do takiego wnioskowania skoro nie było grup samców badanych na poziomie komórek w przysadce w fazie infantylnej (wyłączając 5 tygodniową grupę kontrolną), tylko w gazie juwenilnej (16 tydzień). Wniosek ten powinien być ostatnim, ponieważ wynika on z celu badań jaki został przedstawiony jako ostatni. Wniosek, obecnie jako 4. Powinien pojawić się jako 2.

UWAGI SZCZEGÓŁOWE

1. Str. 3. W odniesieniu do testosteronu właściwsze jest używanie skrótu T. T4 jest raczej używane jako skrót dla tyroksyny.
2. Str. 6. - brak odniesienia ryc. 1. w tekście. Większa czcionka i lepsze zróżnicowanie kolorystyczne ułatwiłoby odczytanie przedstawionych na rycinie informacji.
3. Str. 8. wiersz 4. i 5. – podanej publikacji Romeo i wsp. 2010 brak w spisie literatury
4. Str. 9. wiersz 14. – powinno być Ebling 2005 a jest Ebling i wsp. 2005
5. Str. 16. wiersz 14. – czy cytowanie IZ, 1993 dotyczy norm żywienia owiec autorstwa Osikowski, Porębska i Korman?
6. Str. 16. wiersz 26. – należy zamienić nazwę żyła jarzmowa na żyła szyjna zewnętrzna (łac. *vena jugularis externa*)
7. Str. 19. wiersz 15. - angielski fragment tekstu - HPLC grade cortisol standard
8. Str. 20. wiersz 14. - należy zamienić „Bazowe, czyli niezależne od czasu...” na „Podstawowe, czyli niezależne od czasu....”
9. Str. 20. wiersz 29. - błędnie podano jednostkę wielkości obszaru pola, w którym dokonywano pomiaru.
10. Str. 21. wiersz 7. – należy zamienić określenie „bazowych stężeń” na „podstawowych stężeń”.
11. Str. 21. wiersz . – należy usunąć głównie
12. Str. 22. – wyniki – należy używać określenia stężenia wyższe lub niższe a nie większe lub mniejsze oraz w podawaniu poziomu istotności używać przecinka zamiast kropki, np. $P < 0,05$ a nie $P < 0.05$.
13. Str. 25. – nie trzeba podawać wartości P gdy nie ma istotnych różnic. Wartość P, którą przyjęto dla testu podano już w opisie analizy statystycznej.
14. Str. 44. wiersz 22. – pisownia nazwiska Goursaud (jest Goursard)
15. Str. 44. wiersz 8. i 32. – podanej pracy Mc Cormic i Mathews 1998 brak w spisie literatury
16. Str. 44. wiersz 32. - pisownia Schoenfeld inna niż w spisie literatury (Schoenfeid)
17. Str. 44. wiersz 17-18. – właściwsze jest określenie receptor mineralokortykoidów i glikokortykoidów
18. Str. 45. wiersz 9. – właściwsze jest określenie receptory androgenów
19. Str. 45. wiersz 32. – powinno być Wood i Foster, 1998 (jest Wood i wsp. 1998)
20. Str. 50. wiersz 16 – data publikacji inna (1979) niż podana w spisie literatury (1976)
21. Str. 52. wiersz 4. – podanej pracy Wańkowska i wsp. 2008a nie ma w spisie literatury
22. Str. 54. wiersz 20. i 22. – podanej pracy Pierce i wsp. 2009 a nie ma w spisie literatury

23. Str.58. wiersz 18. – należy określić czy ma być „w” czy „po” 9 tygodniu życia
24. Str. 71. – nie odnaleziono w tekście pracy Romeo RD 2010

Podsumowując ocenę pracy pragnę podkreślić, że uzyskane wyniki są wartościowe, wzbogacają bowiem dotychczasową wiedzę na temat wpływu bardzo wczesnego (35 dni) przerwania odchowu przy matce na mechanizmy odpowiedzialne za proces rozwoju gonad u jagniąt. Mogą przyczynić się także do doskonalenia strategii ‘odsadzania’ jagniąt przeznaczonych do dalszej hodowli na fermach z intensywnym mlecznym użytkowaniem owiec. Przedstawione w recenzji uwagi i zapytania nie zmieniają pozytywnej oceny pracy, wskazują jedynie na pewne niedociągnięcia, które powinny być poprawione na etapie przygotowania prezentacji pracy.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny praca mgr Magdaleny Cieślak pt. ”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 naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r Nr 65 poz. 595 z póź. zm.) 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 Cieślak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



dr hab. n. wet. Janina Skipor, profesor nadzwyczajny