

Rzeszów, 20.04.2016

Prof. dr hab. Marek Koziński
Katedra Fizjologii i Rozrodu Zwierząt
Pozawydziałowy Zamiejscowy Instytut
Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych
Uniwersytet Rzeszowski

OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr Michała Szlisa pt:
Neuromodulacyjne oddziaływanie obestatyny na aktywność osi
somatotropowej i gonadotropowej u owiec**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest opracowaniem ukazującym rolę obestatyny w działaniu modulacyjnym na funkcję osi somatotropowej i gonadotropowej u owiec na poziomie centralnego układu nerwowego. Obestatyna jest stosunkowo nowo poznany peptydem wykazującym zarówno działanie obwodowe, jak i w obszarze OUN. Wcześniejsze badania wykazały, że zarówno neurohormony włączone w regulację pobierania pokarmu - neuropeptyd Y, kisspeptyna, 26RFamid oraz hormony obwodowe jak leptyna i grelina są związkami biologicznie aktywnymi, które również poprzez neuromodulację osi somatotropowej i gonadotropowej wpływają na regulacje procesów wzrostowych i rozrodczych. Oś somatotropowa (podwzgórze-przysadka-tkanki obwodowe) podlega regulacji poprzez antagonistycznie działające neurohormony - somatostatynę i hormon uwalniający hormon wzrostu (GHRH). Receptacja komórek somatotropowych przysadki polega na aktywacji receptorów somatostatynowych i receptorów hormonu uwalniającego hormon wzrostu. Pobudzenie receptorów somatostatynowych prowadzi do obniżenia ekspresji genu hormonu wzrostu (GH), kiedy aktywacja receptora GHRH

powoduje wzrost ekspresji genu GH. Hormon wzrostu jest nadrzędnym hormonem regulującym procesy wzrostowe objawiające się przyrostem masy ciała, wpływa na regulację gospodarki węglowodanowej, zwiększa uwalnianie glukozy z wątroby i wielu innych procesów metabolicznych.

Regulacja osi gonadotropowej (podwzgórze-przysadka-gonady) odbywa się poprzez neurosekrety, z których nadrzędnym, nazwanym przez autora nadającym ton aktywności jest gonadoliberyna (GnRH). GnRH uwalniana jest w sposób pulsacyjny, a układ generatora pulsów współtworzą neurony wykazujące ko ekspresję kisspeptyny, neurokininy B i dynorfiny. Przyjmuje się, że wzrost ilości uwalnianej kisspeptyny stymuluje wyrzut GnRH. Uwalniane kisspeptyny regulowane jest przez neurokininę B i dynorfinę. Badania na myszach wykazały, że neurokinina B stymuluje syntezę kisspeptyny, natomiast dynorfina hamuje. GnRH wpływa na komórki gonadotropowe przysadki poprzez specyficzne receptory (GnRH-R). Aktywacja tych receptorów prowadzi w głównej mierze do stymulacji produkcji hormonu luteinizującego (LH), w mniejszym stopniu do sekrecji hormonu folikulotropowego FSH.

Powszechnie jest wiadomo, iż wszelkie zaburzenia związane z ograniczoną dostępnością lub nadmiarem pokarmu oraz regulacją jego spożycia wywołują zaburzenia procesów związanych z funkcjonowaniem osi somatotropowej i gonadotropowej. Stanowi to problem nie tylko u zwierząt, ale i u ludzi. Wiele ośrodków naukowych na świecie prowadzi intensywne badania nad wyjaśnieniem mechanizmów interakcji (współdziałania) tych dwóch niezwykle ważnych dla prawidłowej funkcji organizmu i całej populacji osi somatotropowej i gonadotropowej.

Przedstawiona do recenzji praca powstała w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie, ośrodku naukowym o dużym dorobku w zakresie prezentowanej tematyki. Zaprezentowane wyniki badań mają na celu wyjaśnienie czy nowopoznany peptyd obestatyna - powstający z tego samego prekursorowego białka, co grelina ma podobne właściwości i czy jest spoiwem łączącym informacje o statusie energetycznym z funkcjonowaniem osi somatotropowej i gonadotropowej.

Nowe techniki badawcze skutkują coraz lepszym poznaniem procesów regulacyjnych w zakresie szeroko pojętej regulacji rozrodu, jak i innych procesów metabolicznych w zakresie ich regulacji. Udział obestatyny w tych procesach, a szczególnie w regulacji funkcjonowania **osi somatotropowej i gonadotropowej** jest mało poznany.

Na podstawie danych z piśmiennictwa światowego Doktorant postawił hipotezę badawczą zakładającą, że obestatyna może być istotnym czynnikiem modulacyjnym nerourohormonalnej regulacji procesów wzrostu i rozrodu na poziomie centralnego układu nerwowego.

Celem zaprezentowanej pracy doktorskiej było potwierdzenie lub zaprzeczenie zaprezentowanej tezy. W tym celu PT Autor zaplanował poniższe 3 zadania badawcze:

1. Określenie ekspresji genów NPY, SOM, GHRH, GnRH, Kiss1, PDyn, NKB w obszarze podwzgórza oraz GH, GnRH-R, LH beta i FSH beta w przysadce u owiec.

2. Lokalizację i immunoreaktywność w neuronach NPY, Som, GnRH w podwzgórzu oraz GH, LH i FSH w komórkach przysadki.

3. Poziom hormonów GH, LH i FSH we krwi obwodowej oraz ich pulsacyjnego uwalniania.

Zdaniem recenzenta zarówno cele badań, jak i zadania badawcze zostały zaplanowane i przedstawione w sposób potwierdzający bardzo dobrą znajomość obszaru badawczego, w którym Autor realizuje swoją tematykę. Załączony manuskrypt opracowany w języku polskim, liczy 88 stron, w tym 5 tabel i 30 rycin. Zawiera następujące rozdziały: streszczenie, wstęp zawierający bardzo bogatą dyskusję z dotychczasową wiedzą na opracowywany temat, hipotezę badawczą i zadania badawcze pracy, materiał i metody badawcze, wyniki, dyskusję, podsumowanie, wnioski i bibliografię praktycznie z czasopism impaktowych, spis tabel i spis rycin. Dodatkowo załączony jest abstrakt w języku angielskim. Manuskrypt napisany jest zrozumiałym językiem z zachowaniem wszystkich wymagań dla opracowań naukowych. Czytelnik pracy w rozdziale zatytułowanym wstęp może zapoznać się z podstawami neurohormonalnej regulacji zarówno procesów metabolicznych, jak i rozrodczych. Rozdział ten opracowany został bardzo starannie i zawiera liczne odwołania do piśmiennictwa światowego.

Autor przeprowadził doświadczenia na 32 tygodniowych jarkach rasy Merynos Polski o masie ciała ok 38,5 kg. Wszystkie czynności związane z wykonaniem badań były prowadzone zgodnie z Ustawą o Ochronie Zwierząt, za zgodą III Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie.

W trakcie badań Autor zastosował nowoczesne metody analityczne z zakresu analizy molekularnej immunodiagnostycznej oraz, co nie często się zdarza, użył unikalnego modelu doświadczalnego wprowadzając przy użyciu aparatu stereotaksycznego kaniule do III

komory mózgu, co umożliwiło infuzję obestatyny bezpośrednio do OUN. Zasluguje to na szczególne podkreślenie, ponieważ niewiele ośrodków naukowych na świecie potrafi połączyć metody analityki laboratoryjnej z technikami chirurgicznymi. Taki układ doświadczenia trudny w wykonaniu umożliwia pełną realizację założonego celu i jego dogłębną analizę.

Uzyskane wyniki wykazały, iż egzogenna obestatyna podawana bezpośrednio drogą infuzji do III komory mózgu powoduje wzrost ekspresji genu NPY w MBH i obniża neurosekrecyjną aktywność neuronów NPY w PEN i ARC. Zmiany aktywności neuronów GHRH i SOM prowadzą do wzrostu ekspresji genu GH i ilości GH magazynowanego w komórkach somatotropowych przysadki, co skutkuje podwyższeniem poziomu GH we krwi obwodowej, wynikającego ze wzrostu liczby pulsów GH.

W zakresie wpływu na oś gonadotropową - zmienia ekspresję genów generatora pulsów GnRH i aktywność neuronów GnRH hamując uwalnianie GnRH zakończeń nerwowych w EM oraz obniża ekspresję genu GnRH - R w przysadce. Powoduje zahamowanie ekspresji genu LH β akumulując ten hormon w komórkach gonadotropowych przysadki oraz obniża poziom LH we krwi obwodowej poprzez zmianę amplitudy jego pulsów. Stymuluje ekspresję genu FSH β powodując akumulację tego hormonu w komórkach przysadki nie wpływając na poziom FSH i jego uwalnianie do krwi obwodowej.

Na podstawie uzyskanych wyników Autor przedstawił następujące wnioski:

W zakresie oddziaływania obestatyny na oś somatotropową:

- obestatyna hamuje aktywność sekrecyjną neuralnego układu NPY w podwzgórzowej owcy, a neurony NPY nie są głównym przekaźnikiem informacji do neurohormonalnej sieci modulującej aktywność osi somatotropowej i gonadotropowej;
- obestatyna moduluje aktywność układu somatotropowego u owcy, powodując zahamowanie aktywności układu somatostatyny i w konsekwencji stymulację sekrecji GH;

W zakresie oddziaływania na oś gonadotropową:

- obestatyna moduluje aktywność układu gonadotropowego u owcy hamując uwalnianie GnRH z zakończeń nerwowych EM i obniża aktywność sekrecyjną komórek w przysadce;
- jednocześnie obestatyna moduluje aktywność sekrecyjną komórek folikulotropowych przysadki owcy, nie wpływając na uwalnianie FSH do krwi obwodowej

Uzyskane wyniki w pełni potwierdziły prawidłowość przedstawionej przez Autora hipotezy badawczej. Jednocześnie stanowią kolejny istotny dowód na ścisłe współdziałanie mechanizmów regulujących funkcję osi zarówno somatotropowej (metabolicznej) jak i gonadotropowej (rozrodczej) i stanowią cenny wkład do dalszego poznania mechanizmów regulacyjnych w obszarze centralnego układu nerwowego.

W ocenianych tezach rozprawy Doktorant wykazał się bardzo dobrym opanowaniem szerokiego warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na szczególne podkreślenie moim zdaniem zasługuje doskonały wybór tematyki, będący kontynuacją szeroko pojętej problematyki badawczej Instytutu, oraz znajomość światowego piśmiennictwa, który umożliwia szeroką dyskusję w odniesieniu do wybranych zagadnień badawczych. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorant posiada ważne w pracy badawczej cechy jak pracowitość, solidność i dociekliwość. Reasumując - przedstawione do recenzji opracowanie stanowi cenny wkład do poznania mechanizmów włączonych w regulację procesów wzrostowych i rozrodczych na poziomie OUN.

Korzystając z praw recenzenta proponowałbym używać zgodnie z obowiązującym mianownictwem anatomicznym zamiast żyła jarzmowa - żyła szyjna zewnętrzna (*vena jugularis externa*), aczkolwiek w wielu opracowaniach naukowych używana jest nazwa żyła jarzmowa.

Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorant posiada ważne w pracy badawczej cechy jak pracowitość, solidność i dociekliwość.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Michała Szlisapt: Neuromodulacyjne oddziaływanie obestatyny na aktywność osi somatotropowej i gonadotropowej u owiec 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.Nr 65, poz 59,Dz. U. 2005 nr 164 poz. 1365 oraz Dz.U z 2011r nr 84 poz.455).– stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonnej o dopuszczenie Pana mgr Michała Szlis do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie mając na uwadze nowatorski charakter badań w zakresie tematyki zastosowane metody i model badawczy pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie w pełni uzasadniony, moim zdaniem, wniosek o wyróżnienie pracy.



Kierownik
Katedry Fizjologii i Rozrodu Zwierząt

prof. dr hab. Marek Koziorowski