

Prof. dr hab. Marek Koziński
Katedra Fizjologii i Rozrodu Zwierząt
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 10.09.2018

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Wojtulewicz
pt: Wpływ fotoperiodu i stanu zapalnego na aktywność sekrecyjną
części guzowatej przysadki samicy owcy.

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem Promotora *dr. hab. inż. Andrzeja Przemysława Hermana, prof. nadzwyczajnego IFiZZ.*

Na rozprawę doktorską składają się trzy – wyszczególnione poniżej – prace oryginalne, opublikowane w języku angielskim w czasopiśmie z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania IF wynosi 4,77, a punktacja wg MNiSW – 75. Oto

publikacje Doktorantki, wchodzące w skład dorobku naukowego przedłożonego w ramach ubiegania się o stopień doktora nauk rolniczych.

1. Wojtulewicz K., Tomaszewska-Zaremba D., Herman A.P., 2017. Endotoxin induced inflammation suppresses the effect of melatonin on the release of LH from the ovine *Pars Tuberalis* explants-ex vivo study. *Molecules*, 22(11), 1933. (IF-3,098, Pkt. MNiSW-30),
2. Król K., Tomaszewska-Zaremba D, Herman A.P, 2016, Photoperiod- dependent effect of inflammation on nocturnal gene expression of proinflammatory cytokines and their receptors in pars tuberalis of ewe. *Journal of Animal and feed sciences* 25,3-11, (IF-1,024, Pkt. MNiSW-20),
3. Wojtulewicz K, Tomaszewska-Zaremba D., Krawczyńska-Tomczyk M., Herman A.P. 2018, The effect on inflammation on the synthesis of luteinizing hormone and GnRH receptor expression in the parstuberalis of ewe during different photoperiodic conditions. *Canadian Journal of Animal Science*, <https://doi.org/10.1139/CJAS-2017-0121>, (IF-0,657, Pkt. MNiSW-25).

Indywidualny wkład doktorantki w powstanie zaprezentowanych prac oryginalnych potwierdzony przez współautorów należy uznać za wystarczający do przedłożenia Radzie Naukowej w celu dalszego postępowania. Doktorantka uczestniczyła we wszystkich etapach ich tworzenia, od opracowania koncepcji i metodyki badań po przygotowanie pracy do druku(oświadczenia PT Współautorów).

Tematyka załączonych tytułów publikacji dotyczy zagadnień związanych z rolą, jaką odgrywa część guzowata przysadki (*Pars Tuberalis*) w integracji oddziaływania fotoperiodu i stanu zapalnego na sekrecję gonadotropin w sezonie anestrlnym i fazie pęcherzykowej cyklu estralnego u owcy.

Załączony, opracowany w języku polskim manuskrypt, który poprzedza załączone oryginalne prace, liczy 45 stron. Zawiera następujące rozdziały: wstęp przedstawiający bogatą dyskusję z dotychczasową wiedzą na opracowywany temat, hipotezę badawczą i cel naukowy pracy, materiał i metody, omówienie najważniejszych wyników prac eksperymentalnych, podsumowanie i wnioski. Zawiera 14 stron

piśmiennictwa, kserokopie oryginalnych prac oraz oświadczenia PT Autorów o wkładzie osobistym Doktorantki w ich wykonanie. Część "opisową" manuskryptu zamyka abstrakt i streszczenie. Manuskrypt napisany jest poprawnym językiem z zachowaniem wymagań przewidzianych dla opracowań naukowych.

Część guzowata przysadki uznawana jest za regulator aktywności sekrecyjnej dystalnej części przysadki. Może przez to istotnie wpływać na uwalnianie gonadotropin z przysadki. Również część guzowata pełni istotną rolę w fotoperiodyczno-zależnej regulacji endokrynnej w obszarze układu rozrodczego. Badania z użyciem szczurów metodą *ex vivo* wykazały, że melatonina hamuje indukowaną GnRH sekrecję LH z części guzowatej, stymulując jednocześnie sekrecję GnRH z wyniosłości przyśrodkowej.

Stany zapalne są przyczyną wielu zaburzeń regulacji rozrodu poprzez zachwianie regulacji funkcyjnej osi podwzgórze-przysadka-gonady (HPG), głównie poprzez hamowanie sekrecji GnRH-LH, niezależnie od tego czy mamy do czynienia ze stanem ostrym, czy przewlekłym. Stan zapalny obniża również ekspresję genu i białka GnRHR w przednim płacie przysadki, a tym samym syntezę LH. Obniżenie poziomu syntezy LH następuje niezależnie od stanu fizjologicznego układu rozrodczego, tzn. zarówno w czasie anestrus, jak i fazy pęcherzykowej. Bazując na istniejącym stanie wiedzy Autorka przedstawiła hipotezę badawczą zakładającą, że stan zapalny wywołany iniekcją endotoksyny bakteryjnej wpływa na sekrecję LH i ekspresję GnRHR w części guzowatej u owcy, wraz z próbą określenia czy pora doby jak i status rozrodczy są czynnikami modulatorowymi. Dodatkowo Doktorantka podjęła się trudu określenia wpływu warunków fotoperiodycznych na transkrypcję cytokin prozapalnych w PT.

Hipoteza badawcza Pani mgr Karoliny Wojtulewicz stanowi poszerzenie i rozwinięcie tematyki badawczej Instytutu - jednostki niezwykle zasłużonej w badaniach nad szeroko pojętą neuroregulacją precyzyjnych i złożonych mechanizmów leżących u podłoża procesów ze szczególnym uwzględnieniem osi *podwzgórze-przysadka-nadnercza/gonady*. Wiedza ta może mieć kluczowe znaczenie dla poznania dalszych szczegółowych mechanizmów regulacji rozrodu.

Zakres badań, których celem było potwierdzenie lub wykluczenie słuszności założonej hipotezy obejmował określenie wpływu melatoniny na sekrecję LH w eksplantach części guzowatej przysadki samic owcy w czasie fazy pęcherzykowej różniących się statusem immunologicznym, wpływu stanu zapalnego w okresie długiego i krótkiego dnia świetlnego na ekspresję genów cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TNF α) w okresie nocy oraz ich receptorów w pars tuberalis oraz przebadanie wpływu stanu zapalnego na ekspresję LH oraz receptorów GnRH w pars tuberalis w sezonie anestrалnym i fazie pęcherzykowej cyklu owcy w dzień i nocy. Owce przeznaczone do badań przebywały w indywidualnych klatkach, a ich użycie poprzedzała adaptacja do zmienionych warunków. Zwierzęta żywione były zgodnie z przewidzianymi normami opracowanymi w Instytucie Zootechniki w Balicach. W celu ujednoczenia statusu hormonalnego w zakresie rozrodczości zwierzęta poddane były synchronizacji.

W trakcie badań Autorka zastosowała nowoczesne metody analityczne, m.in. RIA, hodowle *ex vivo* pars tuberalis, PCR, Real-Time PCR, Blott. Użycie takich metod analitycznych oraz odpowiednio pobrany materiał badawczy umożliwiły pełną realizację założonego celu, a jego dogłębna analiza poskutkowała przyjęciem prac do druku w „impaktowych” czasopismach.

Do analizy statystycznej zastosowano programy Statistica 10 oraz GraphPad Prism. Dane analizowano za pomocą dwuczynnikowej i trzyczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) w celu wykrycia interakcji między badanymi czynnikami. Po analizach wariancji wykonywano test *post-hoc*, wyniki uznawano za istotnie różne przy $p < 0,05$.

Analiza uzyskanych wyników prac zaprezentowanych do oceny jako dysertacja wykazała stymulujący wpływ GnRH na uwalnianie LH z eksplantów *pars tuberalis* pobranych od owiec i inkubowanych w tzw. układzie kontrolnym. Dodatek GnRH do medium inkubacyjnego stymulował również ekspresję genu LH β . Dodatek melatoniny do medium w czasie inkubacji nie wpływał na sekrecję LH, natomiast obniżał sekrecję LH stymulowaną GnRH.

Oddziaływanie melatoniny i GnRH na ekspresję genu MT1 i GnRHR w badanych eksplantach wykazały ich supresyjne oddziaływanie w obu przypadkach

u owiec po infuzji NaCl, kiedy zanotowano brak efektu po inkubacji eksplantów z melatoniną i GnRH na ekspresję genu GnRHR. W eksplantach pozyskanych od owiec po infuzji LPS zaobserwowano istotnie wyższą ekspresję genów GnRH i MT1, natomiast melatonina istotnie obniżyła ($p \leq 0,05$) ekspresję genów IL-1 β , IL-6, iTNF wyłącznie w eksplantach z tkanek PT po infuzji NaCl. Analiza tkanki z PT owiec po infuzji LPS wykazywała wzrost ($p \leq 0,05$) ekspresji IL-6, ale obniżkę ekspresji genu TNF w porównaniu z tkankami po infuzji NaCl.

Kolejne zaprezentowane przez Autorkę wyniki dotyczyły wpływu długości dnia świetlnego i pory dnia oraz różnego statusu immunologicznego na ekspresję genów kodujących receptory cytokin prozapalnych w obszarze PT. W pracy nr 2 Autorka po raz pierwszy prezentuje wyniki dokumentujące obecność w PT receptorów cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6 iTNF). Ich obecność słusznie zasugerowała Autorce, iż pełnią one funkcje regulacyjne w procesach regulujących procesy rozrodcze. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że ani stan zapalny, ani zmienność fotoperiodu nie wpływają na ekspresję receptora IL-1 typu 1 (IL-1R1). Po infuzji LPS zwiększało jednakże ekspresję genu IL-6ST kodującego glikoproteinowy przekaźnik sygnału IL-6 w czasie nocy przesilenia zimowego, nie wpłynęło jednak na poziom mRNA genu kodującego ekspresję receptora IL-6. Odmiennie infuzja LPS i wywołany nią stan zapalny podwyższały ekspresję mRNA dla receptorów TNF w obszarze PT w okresie długich nocy. Wydaje się, że przyczyną takiej reakcji na stan zapalny może być dominacja melatoniny w czasie długich nocy, która m.in. bierze udział w stymulacji układu immunologicznego w ostrym stanie zapalnym, aktywuje monocyty oraz stymuluje syntezę cytokin prozapalnych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktoranta jako pierwsza wykazała to zjawisko. Stan zapalny wywołany infuzją LPS obniża poziom melatoniny w okresie dnia długiego, kiedy w okresie krótkiego dnia wydaje się nie mieć wpływu, co jest skutkiem obniżenia m.in. w tym okresie poziomów serotoniny - ważnego ogniwa szlaku syntezy melatoniny. Melatonina oddziałuje na gonadotropowe struktury przysadki poprzez umiejscowione tam receptory melatoninowe. Badania Autorki wykazały, że transkrypcja mRNA MT1 w obszarze PT wykazuje zmienność sezonową i okołodobową. W ciągu dnia ekspresja genu MT1 jest wyższa w porównaniu

do nocy, podobnie jak w czasie krótkiego dnia wyższa niż w czasie długiego. Synteza LH w *pars tuberalis* u owcy wykazuje sezonowe i dobowe zmiany, aczkolwiek ekspresja mRNA LH β wykazuje stałość. Ekspresja białka LH w *pars tuberalis* jest wyższa w fazie anestralnej niż folikularnej.

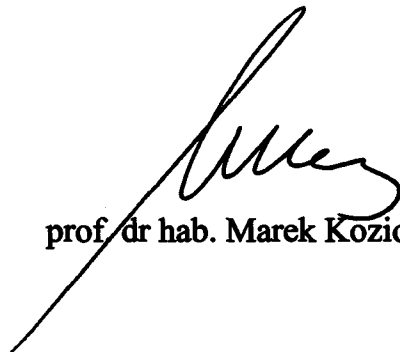
Reasumując, przedstawione do recenzji opracowanie wraz z załączonymi oryginalnymi opublikowanymi pracami stanowią cenny wkład do poznania mechanizmów włączonych w regulację aktywności sekrecyjnej układu podwzgórze-przysadka-gonady u owiec w zmiennych sezonowo warunkach środowiska, jak i w zmienionym statusie układu immunologicznego wywołanego infuzjami LPS.

W ocenianym opracowaniu oraz załączonych pracach Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem szerokiego warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje moim zdaniem doskonały wybór tematyki, będący kontynuacją szeroko pojętej problematyki badawczej macierzystego Instytutu, oraz znajomość światowego piśmiennictwa, która umożliwia szeroką dyskusję w odniesieniu do wybranych zagadnień badawczych. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada ważne w pracy badawczej cechy, takie jak pracowitość, solidność i dociekliwość.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Wojtulewicz pt: **Wpływ fotoperiodu i stanu zapalnego na aktywność sekrecyjną części guzowatej przysadki samicy owcy** w opinii recenzenta spełnia wszystkie wymagania – określone w art. 13 us.1 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. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Fizjologii Żywienia Zwierząt imienia Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłoncej o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Wojtulewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie mając na uwadze wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań i ich twórczy charakter, co również uznali recenzenci kwalifikujący prace do druku w czasopiśmie o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie w pełni uzasadniony moim zdaniem wniosek o wyróżnienie pracy.



prof. dr hab. Marek Koziński