

Prof. dr hab. Andrzej Sechman  
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt  
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
Al. Mickiewicza 24/28

Kraków, 12.11.2016r.

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Chmielewskiej

**pt. „Stresogenny wpływ wczesnego odsadzenia na czynności układu podwzgórzowo-somatotropowego u jagniąt zależnie od płci”**

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

U owiec w okresie wczesnej ontogenezy, obejmującej okres ciąży, a następnie postnatalnego rozwoju, można wyróżnić przyjemniej dwa momenty kluczowe, którym musi sprostać rozwijający się organizm. Pierwszy z nich następuje w momencie porodu, w którym dochodzi do gwałtownego rozdzielenia matki z płodem, natomiast drugi związany jest z momentem przerwania odchowu przy matce, który u jagniąt odchowywanych systemem tradycyjnym następuje w okresie od 56 do 120 dnia życia. Kluczową rolę w obu tych wydarzeniach odgrywają układy hormonalne, a przede wszystkim hormony układów podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) i somatotropowego. Poznanie interakcji występujących pomiędzy tymi układami, szczególnie na poziomie podwzgórza i przysadki mózgowej od wielu lat stanowiło i nadal stanowi wyzwanie dla współczesnej endokrynologii.

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Chmielewskiej, wykonana w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt (IFiZZ) PAN w Jabłonie, pod kierunkiem doktor habilitowanej Marty Wańkowskiej, obejmuje 92 strony i jest podzielona na 13 rozdziałów. Rozdział pierwszy stanowią 2 strony zawierające wykaz skrótów, który ułatwia lekturę całej pracy. Kolejne dwa rozdziały (obejmujące w sumie 6 stron) zawierają streszczenia, polsko- i anglojęzyczne. Zdaniem recenzenta obydwie streszczenia są dobrze napisane, jednak zbyt długie i nienadające się do umieszczenia w bazach danych.

W pracy Autorka podejmuje badania dotyczące roli układu podwzgórzowo-somatycznego oraz interakcji między tym układem a układem HPA u jagniąt obu płci podczas stresu związanego z ich odsadzeniem od matki. Autorka stawia hipotezę badawczą zakładającą, że wczesne przerwanie odchowu przy matce jest czynnikiem stresogennym, który zmienia czynność obu układów oraz wpływa na wzrost somatyczny jagniąt, a reakcja ta zależna jest od płci. Podstawowym celem pracy jest weryfikacja tej hipotezy w oparciu o zadania badawcze przedstawione w rozdziale „Hipoteza i cele pracy” (rozd. 5). Został on poprzedzony obszernym rozdziałem zatytułowanym „Wstęp” (rozd. 4), składającym się z aż 6 podrozdziałów i liczącym 12 stron maszynopisu, w którym opisane zostały poszczególne fazy postnatalnej ontogenezy: okres noworodkowy (neonatalny trwający do 3. tyg. życia), przejściowy (infantylny – od 3. do 9. tyg. u samców i 12 tyg. u samic) i dojrzewania płciowego (juwenilny – trwający do ok. 16. tyg. życia). Autorka wyjaśnia, że mając na uwadze optymalny rozwój, jagnięta pozostawia się przy matce przynajmniej do 8 tyg. życia, co ma niebagatelne znaczenie dla ich prawidłowego wzrostu i rozwoju. Przerwanie odchowu

przy matce, które związane jest przede wszystkim z aktywacją układów hormonalnych, wpływa na rozwój płciowy i somatyczny, co wykazały wcześniejsze badania prowadzone w Zakładzie Endokrynologii IFiZZ PAN (rozdz. 4.1). Kluczową rolę w odpowiedzi na reakcję stresową pełni układ współczulno-nadnerczowy (SAS) oraz układ HPA, które regulują uwalnianie odpowiednio amin katecholowych z rdzenia nadnerczy i glikokortykoidów z ich kory. Czynność tych układów, związana z syntezą i uwalnianiem kortykoliberyny (CRF) i wazopresyny argininowej (AVP) z podwzgórza oraz hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) z przysadki mózgowej, zależy od płci; jest ona modulowana przez hormony gonad zarówno u samic jak i samców (rozdz. 4.2). Wiele danych literaturowych wskazuje, że zarówno tymczasowe, jak i długotrwałe przerwanie odchowu przy matce wpływa na funkcje osi HPA, a reakcja ta mierzona zmianami stężenia kortyzolu we krwi jest również zależna od płci (rozdz. 4.3). W okresie postnatalnej ontogenezy procesy wzrostu i rozwoju są regulowane przez wiele układów hormonalnych. Szczególną rolę w tym okresie odgrywiają hormony układu somatotropowego: hormon wzrostu (GH) i insulinopodobne czynniki wzrostu (IGF-1 i IGF-2). Aktywność tego układu nie tylko wpływa na rozwój osi podwzgórze-przysadka-gonady, lecz przede wszystkim warunkuje prawidłowy postęp ontogenezy. Funkcja i rozwój układu somatotropowego u owiec, w którym somatostatyna wydzielana z podwzgórza odgrywa zasadniczą rolę, jest zakończony około 12 tyg. życia; ważną rolę w rozwoju tego układu pełnią hormony gonad (rozdz. 4.4). W rozdziale 4.5. Autorka opisuje wpływ stresu przerwania odchowu przy matce na czynność układu somatotropowego rosnących zwierząt (głównie szczurów). Wyjaśnia, że w literaturze niewiele jest danych dotyczących wpływu stresu tymczasowego bądź trwałego odseparowania od matki na sekrecję GH i procesy wzrostowe u jagniąt (szczególnie brak jest porównania oddziaływania tego czynnika u samic i samców). Ostatni rozdział wstępu (rozdz. 4.6) jest zatytułowany „Podsumowanie”, w którym Autorka uzasadnia podjęcie badań w opisywanym w poprzednich rozdziałach obszarze. Zdaniem recenzenta ponowne wyjaśnianie celów badań, które znajdują się w rozdziale 5 nie było konieczne. Nie mniej jednak należy podkreślić, że przedstawiona przez Autorkę koncepcja badań opiera się na bardzo dobrej znajomości piśmiennictwa, które jest w pełni adekwatne do tematu pracy i podjętych badań, i które zostało umiejętnie wykorzystane w uzasadnieniu ich celowości, a także w omówieniu wyników uzyskanych w zaplanowanym doświadczeniu. Uwagi do rozdziału „Wstęp”: proszę Autorkę o wyjaśnienie, dlaczego Jej zdaniem ontogeneza trwa tylko do osiągnięcia dojrzałości płciowej, a nie do naturalnej śmierci organizmu?

Rozdział 6. pt. „Materiały i Metody” został podzielony na 8 podrozdziałów, w których Autorka dysertacji zawarła szczegółowy opis przeprowadzonego doświadczenia, zastosowanych procedur oraz metod analitycznych i statystycznych. Doświadczenie wykonano na jagniętach (tryczkach: n=18 i maciorkach: n=18) pochodzących od matek rasy polska owca długowłnista utrzymywanych w IFiZZ PAN w Jabłonie. Po urodzeniu jagnięta przydzielono do trzech grup uwzględniając podział ze względu na płeć. Pierwszą grupę stanowiły jagnięta 5-tygodniowe pozostające przy matce, dekapitowane po pobraniu krwi w 5 tygodniu życia. Jagnięta z grupy drugiej (kontrolnej) odsadzano od matki w wieku 9 tygodni, natomiast grupy trzeciej (tzw. grupa stresowana) - w wieku 5 tygodni. Krew od jagniąt z tych grup pobierano najpierw w 9 i 12 tyg., a następnie tuż przed dekapitacją w 16 tyg. życia (informacja zawarta w Tabeli 1). Po wykonaniu perfuzji mózgowia i jego utrwaleniu pobierano tkanki obejmujące struktury podwzgórza i przysadki mózgowej. Metodykę dotyczącą pobierania i wstępnej obróbki tkanki mózgowej przedstawiono w rozdziale 6.3., natomiast procedury barwienia immunocytochemicznego skrawków kriostatowych podwzgórza i parafinowych przysadki mózgowej przedstawiono w rozdziałach odpowiednio 6.4. i 6.5. W podrozdziale 6.7 zaprezentowano opis analizy komputerowej obrazu histologicznego uzyskanych preparatów mikroskopowych przedstawiających

immunopozytywną reakcję dla CRF i somatostatyny w obszarach podwzgórza oraz GH i ACTH w preparatach z części gruczołowej przysadki mózgowej. Procedury te są bardzo dokładnie i precyzyjnie opisane, co świadczy o bezpośrednim udziale Doktorantki w tych oznaczeniach. W podrozdziale 6.6. Autorka przedstawiła metodę radioimmunologicznego oznaczania kortyzolu i GH we krwi. Zdaniem recenzenta nie było potrzeby wpisywania w tytule tego rozdziału nazwy anglojęzycznej tej metody. Ostatni podrozdział tej części pracy dotyczy metod statystycznych użytych do opracowania wyników badań. Zostały one dobrze dobrane i pozwalają na obiektywną ocenę istotności różnic uzyskanych pomiędzy grupami badawczymi.

W odniesieniu do informacji przedstawionych w rozdziale „Materiał i Metody”, uprzejmie proszę Doktorantkę o wyjaśnienie następujących kwestii:

- (i) dlaczego w tekście rozdziału 6.1. podano, że jagnięta grupy III odsadzano w wieku 6 tyg., a w Tabeli 1 wiek jagnięt w momencie odsadzenia wynosił 5 tyg.?
- (ii) skoro celem badań było określenie wpływu stresu wczesnego odseparowania jagnięt od matki na czynność układu somatotropowego, czy uzasadnionym było tworzenie grupy pierwszej? Zdaniem recenzenta jeżeli Autorka zdecydowała się na tę grupę to należało jeszcze utworzyć grupę czwartą, w której jagnięta kontrolne byłyby dekapitowane w 9 tygodniu życia (grupa ta stanowiłaby odniesienie do grupy drugiej),
- (iii) czy sama zmiana żywienia jagnięt z grupy III w okresie między 5 a 9 tygodniem życia nie mogła wpłynąć na wyniki eksperymentu?
- (iv) krew od jagnięt z grupy II i III pobierano w 64, 89 i 113 dniu życia; czy nie należało także pobrać krew od tych zwierząt w 40 dniu ich życia (tak jak w grupie pierwszej)?
- (v) krew do badań pobierano z żyły szyjnej w odstępach 10-minutowych przez 5 godzin w celu określenia pulsacyjnego uwalniania GH; czy taka procedura nie jest zbyt stresogenna dla jagnięcia?

W rozdziale siódmym zatytułowanym „Wyniki”, którego treść podzielono na 5 podrozdziałów (obejmujących 15 stron pracy), Doktorantka przedstawiła bogatą dokumentację obejmującą łącznie 10 rycin, na których przedstawiła uzyskane w badaniach własnych wyniki. Ich prezentacja, w przeważającej części na wykresach, jest dobrze przemyślana, zwracając uwagę na jakość zdjęć z pod mikroskopu, dokumentujące wyniki analiz immunohistochemicznych - dla CRF i somatostatyny w podwzgórzu oraz ACTH i GH w przysadce mózgowej badanych owiec (Ryc. 1, 2, 5 i 6). Wyniki analiz komputerowych obrazów mikroskopowych zostały zebrane i umiejętnie przedstawione na Rycinie 3 [CRF w neuronach jądra przykomorowego (PVN) i wyniosłości przyśrodkowej (ME) podwzgórza oraz ACTH w komórkach kortykotropowych przysadki mózgowej] i Rycinie 7 [somatostatyna w neuronach jądra okołokomorowego (PEV) i ME podwzgórza oraz GH w komórkach somatotropowych przysadki]. Z kolei na Rycinie 4 Autorka przedstawiła średnie stężenie kortyzolu w osoczu krwi obwodowej samców i samic jagnięt kontrolnych i odsadzonych w 5 tyg. życia, natomiast na Rycinie 8 – wyniki dotyczące stężenia, amplitudy i częstotliwości pulsów GH (w ciągu 5 godzin.) we krwi badanych owiec. Na uwagę zasługują niewielkie słupki błędów (S.E.M.) zaznaczone na wykresach, które wskazują na wielką precyzję osoby wykonującej oznaczenia i przeprowadzającej analizy. Wykresy obrazujące reprezentatywne profile pulsacyjnego uwalniania GH u jagnięt (samców i samic) kontrolnych (grupa I) w 5 tyg. życia oraz kontrolnych (grupa II) i odsadzonych w 5 tyg. życia (grupa III) przedstawiono na Ryc. 9. Ostatnia Rycina 10 przedstawia masę ciała i dzienne przyrosty masy ciała samców i samic jagnięt kontrolnych i wcześniej odsadzonych. Wyniki uzyskane przez Autorkę dysertacji wskazują, że zmiany dotyczące

populacji perikarionów CRF i somatostatyny w podwzgórzu oraz komórek immunoreaktywnych ACTH i GH w przysadce mózgowej u jagniąt wcześniej odsadzonych od matki zależą od płci. U 16-tygodniowych samców odseparowanie od matki w 5. tyg. życia zwiększa populację komórek nerwowych zawierających CRF w PVN, zmniejsza liczbę zakończeń neuronów zawierających CRF w ME oraz zwiększa populację komórek dla ACTH w przysadce mózgowej. Ponadto stymuluje uwalnianie kortyzolu w fazie infantylnej ontogenezy, a hamuje podczas dojrzewania płciowego. U samic będących w tym samym wieku, poddanych wczesnemu odsadzeniu od matki, stwierdzono zwiększenie populacji perikarionów CRF w PVN, jednak w przysadce mózgowej nie obserwowano zmian liczby komórek immunopozytywnych dla ACTH. U samic w porównaniu do samców wykazano stymulację sekrecji kortyzolu również w fazie juwenilnej ontogenezy. Wykazano istotny wpływ wczesnego odsadzenia od matki na czynności układu somatotropowego; u samców obserwowano zwiększenie populacji neuronów dla somatostatyny w jądrze PEV, a także w ME podwzgórza, natomiast zmniejszenie ilości komórek wydzielających GH w przysadce mózgowej; u samic wykazano zwiększoną akumulację somatostatyny w perikarionach PEV, której jednak towarzyszyło zmniejszenie ilości tego hormonu w ME oraz wzrost akumulacji GH w komórkach przysadki mózgowej. Zarówno u samic, jak i samców jagniąt stymulujący wpływ wczesnego odsadzenia na uwalnianie GH w okresie infantylnym zmienił się na hamujący w okresie juwenilnym. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań są ciekawe i nowatorskie. Mogą one przyczynić się do wyjaśnienia interakcji pomiędzy układem HPA a układem somatotropowym u ludzi i innych gatunków zwierząt.

Wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę zostały omówione na 20 stronach maszynopisu w rozdziale „Dyskusja”, który został podzielony na trzy podrozdziały dotyczące wpływu wczesnego odsadzenia jagniąt od matki na czynności układu HPA (rozdział 8.1) i somatotropowego (8.2) oraz interakcje pomiędzy tymi dwoma układami (8.3) w trakcie wzrostu i rozwoju płciowego. W rozdziałach tych Autorka dysertacji umiejętnie analizuje wyniki badań własnych odnosząc je do piśmiennictwa z tego zakresu, w przeważającej części dotyczącego szczurów i owiec. Ta część pracy stanowi niewątpliwie istotny wkład Doktorantki dotyczący wyjaśnienia procesów endokrynnych zachodzących w obszarze podwzgórza i przysadki mózgowej jagniąt podczas fazy infantylnej i juwenilnej rozwoju ontogenetycznego oraz roli układów HPA i somatotropowego u jagniąt poddanych działaniu stresu wczesnego przerwania odchowu przy matce. Tekst poszczególnych podrozdziałów jest napisany w sposób zwięzły i precyzyjny, co świadczy o umiejętności syntetycznego podejścia do opisywanego zjawiska, właściwej interpretacji oraz umiejętności dyskusji wyników badań własnych, w świetle dotychczasowych poglądów uczonych nie tylko z ośrodków zagranicznych, lecz również z własnego zespołu. Nie mniej jednak bardzo proszę Autorkę o wyjaśnienie, dlaczego nie zdecydowała się na oznaczanie stężenia insuliny, IGF-1, czy też hormonów układu podwzgórze-przysadka-tarczyca we krwi badanych jagniąt (zresztą o tym Autorka wspomina na stronie 65 swojej pracy). Oznaczenia te mogłyby przyczynić się do wyjaśnienia, obserwowanych w okresie juwenilnym, zmian dziennych przyrostów masy ciała pomimo zmniejszonego uwalniania GH.

Rozdział „Podsumowanie” (rozdz. 9) jest dobrze napisany i nie budzi zastrzeżeń recenzenta. Uważam takie podsumowanie za dobry pomysł, aby w logicznej i przejrzystej formie dokonać syntetycznego ujęcia wyników przeprowadzonych eksperymentów. Autorka pracy sformułowała 6 wniosków, które umieściła w rozdziale pod tym samym tytułem (rozdz. 10). Są one bardzo rozbudowane, chociaż uzasadnione z punktu widzenia otrzymanych wyników opisywanych w poprzednich rozdziałach pracy. Zdaniem recenzenta we wniosku nr 1 Autorka niepotrzebnie wspomina o niewątpliwym wpływie hormonów gonad, które odgrywają kluczową rolę w regulacji układu HPA u jagniąt we wczesnym okresie

infantylnym. Wniosek ten wynika raczej z wcześniejszych badań publikowanych przez Promotora rozprawy niż z wyników uzyskanych przez Doktorantkę (w prezentowanych badaniach nie oznaczano stężenia hormonów gonadotropowych, ani hormonów gonad we krwi). Wniosek nr 6, a także wniosek końcowy wskazują, że cel badań został osiągnięty a postawiona hipoteza badawcza pozytywnie zweryfikowana.

Końcowe trzy rozdziały to: „Bibliografia” (rozdz. 11), „Spis rycin” i „Spis tabel”. Autorka pracy cytuje 159 pozycji piśmiennictwa, które pod względem merytorycznym nie budzą zastrzeżeń recenzenta i są ściśle związane z treścią opracowania. W spisie tym brakuje jednego cytowania, które pojawia się w tekście pracy na str. 32 (Merriam i Watcher 1982). Z kolei w Bibliografii znalazłem jedną pozycję (nr 157), której nie cytowano w żadnym rozdziale pracy. Praca napisana jest komunikatywnym językiem. Uwagi i drobne błędy edytorskie są zaznaczone w egzemplarzu pracy recenzenta, a Autorka może je rozważyć przy przygotowywaniu pracy do publikacji.

Podsumowując, uważam przedstawioną mi do oceny pracę doktorską Pani mgr Natalii Chmielewskiej za ciekawą i merytorycznie bardzo dobrą. Pomimo kilku uwag wyrażonych w mojej recenzji stwierdzam jednoznacznie, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska pt. „Stresogenny wpływ wczesnego odsadzenia na czynności układu podwzgórzowo-somatotropowego u jagniąt zależnie od płci” spełnia wymogi określone w art. 13 „*Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*” z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Wnioskuje zatem o dopuszczenie przez Radę Naukową Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego w Jabłonie Pani mgr Natalii Chmielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Sedlaczek