

Dr hab. Katarzyna Grzelkowska-Kowalczyk
Katedra Nauk Fizjologicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
SGGW w Warszawie
02-776 Warszawa
ul. Nowoursynowska 159
e-mail: k_grzel_kow@poczta.fm

Warszawa, 15.05.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Witkowskiej

pt.: „Zależność pomiędzy krótkoterminowym uzupełniającym żywieniem owiec w okresie ciąży i laktacji, a aktywnością osi somatotropowej, ekspresją receptorów leptynowych w przysadce mózgowej i tempem dojrzewania płciowego jarek”

wykonanej w Zakładzie Patofizjologii Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, pod kierunkiem Dr hab. Urszuli Kosior-Korzeckiej.

Recenzja została wykonana na podstawie uchwały Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dn. 27 kwietnia 2017 r.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Witkowskiej dotyczy tzw. programowania rozwojowego, zjawiska o znaczeniu ogólnobiologicznym, którego poznanie zasługuje na szczególną uwagę w naukach weterynaryjnych, zootechnicznych i medycznych. Koncepcja „programowania rozwojowego” zakłada, że bodziec działający w okresie wzrostu i rozwoju prenatalnego wprowadza długotrwałe zmiany rozwojowe i fizjologiczne w kluczowych tkankach lub układach narządów. Niedożywienie płodu powoduje uruchomienie serii fizjologicznych i/lub metabolicznych adaptacji, polegających na priorytetowym rozwoju ważnych narządów, takich jak mózg, kosztem innych, np. trzustki i mięśni szkieletowych. Zgodnie z tą hipotezą, niedostateczne odżywianie wewnątrzmaciczne trwale zmienia („programuje”) rozwój i metabolizm organizmu, indukując zmiany fizjologiczne w okresie po-urodzeniowym, korzystne dla przeżycia potomstwa trwale narażonego na niedożywienie (np. hiperfagię, odkładanie tłuszczu). Badania wykazały, że niska masa urodzeniowa, jedno z następstw rozwojowego zaprogramowania organizmu przez niekorzystne warunki *in utero*, predysponuje owce do zaburzeń wzrostu i dojrzewania płciowego, u prosiąt skutkuje często wysoką zawartością kolagenu i tkanki tłuszczowej w mięśniach szkieletowych, a u ludzi prowadzi do objawów zespołu metabolicznego, takich jak nadciśnienie tętnicze, otyłość, cukrzyca typu 2. U podstaw tych zaburzeń leżą zmiany strukturalne niektórych narządów, modyfikacje szlaków sygnałowych i metabolicznych, mechanizmy epigenetyczne oraz dysfunkcja mitochondriów. Owca jest doskonałym modelem do badań prenatalnego programowania zaburzeń wieku dorosłego, ponieważ rozwój tkanki tłuszczowej oraz sieci neuronów podwzgórza regulującej pobieranie pokarmu i równowagę energetyczną, zachodzi, tak jak u ludzi, przed narodzinami. Podobny przebieg zjawisk rozwojowych przesądza o większej wartości wyników badań prowadzonych na owcach, jako modelu

doświadczalnym, w porównaniu z modelem gryzoni. W świetle powyższych danych, podjęty przez Doktorantkę temat badawczy jest interdyscyplinarny i niezwykle istotny pod względem poznawczym. Ponadto, wobec istniejącej potrzeby poszukiwania strategii hodowlanych podnoszących wydajność reprodukcyjną, poznanie efektu krótkotrwałego ukierunkowanego żywienia matek na potomstwo predysponowane do zaburzeń wzrostu i dojrzewania płciowego, ma duże znaczenie praktyczne.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej i uwagi

Przedstawione do oceny opracowanie obejmuje 154 strony maszynopisu i ma formę klasycznej rozprawy. Dzieło zawiera stronę tytułową, podpisane oświadczenia Autorki i Promotora pracy, spis treści, wykaz stosowanych skrótów, streszczenia w jęz. polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję i piśmiennictwo.

W rozdziale Wstęp Autorka rozprawy przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczącej wybranych aspektów regulacji procesów związanych z osiągnięciem dojrzałości płciowej i utrzymaniem aktywności rozrodczej zwierząt gospodarskich. Najwięcej uwagi poświęcono leptynie: Doktorantka przedstawiła ogólną charakterystykę tego hormonu, jego znaczenie biologiczne i molekularny mechanizm działania. Bardzo szczegółowo i obszernie został opisany wpływ leptyny na aktywność osi hormonalnej podwzgórze-przysadka mózgowajajniki w czasie dojrzewania płciowego, w ciąży i laktacji, również w aspekcie sezonowej kontroli aktywności rozrodczej owiec. Sporo miejsca Autorka poświęciła udziałowi leptyny w regulacji osi somatotropowej: wydzielaniu hormonu wzrostu, insulinopodobnego czynnika wzrostu-I, oraz powiązanej z tzw. „systemem IGF” insuliny. Tak szczegółowy opis udziału leptyny w regulacji aktywności osi somatotropowej i gonadotropowej dobrze dokumentuje znaczącą rolę tego hormonu w kontroli wzrostu i dojrzewania płciowego, kluczowych aspektach warunkujących wydajność hodowlaną. Nie do końca zgadzam się ze stwierdzeniem ze str. 29, że „*Insulina i leptyna należą do hormonów odpowiedzialnych za długoterminową regulację przyjmowania pokarmu.*”. Nie kwestionując istotnej roli obu hormonów w integracji procesów metabolicznych i rozrodczych, należałoby podkreślić różnice w ich działaniu, ponieważ insulina jest kojarzona również z krótkoterminową kontrolą uczucia głodu i sytości, poprzez wspomaganie działania podwzgórzowego „glukostatu”. W tej części Wstępu, zapewne w celu podniesienia czytelności opracowania, Autorka zamieściła kilka rycin (Ryc. 1-6) ze schematami opisywanych procesów regulacyjnych. Ryciny nie spełniają jednak tego zadania, ponieważ zostały zamieszczone w wersji oryginalnej, zaczerpniętej z artykułów źródłowych, a ich opisy są zbyt skromne i nie zawierają objaśnień symboli uwidocznionych na rycinach. Przykładem może być Rycina 3 ze str. 28: dopiero po lekturze źródłowej publikacji, z której pochodzi (*Farhy i wsp. 2007 Model-projected mechanistic bases for sex differences in growth hormone regulation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 292, 1577-1593*), a zwłaszcza zapoznaniu się z objaśnieniami strzałek i symboli literowych oraz, ogólnie porównawczym ujęciem regulacji uwalniania hormonu wzrostu u osobników różnej płci, można w pełni odczytać sens schematu. W moim przekonaniu, oryginalne anglojęzyczne ryciny należało zmodyfikować na potrzeby rozprawy doktorskiej, dostosować je do zilustrowania konkretnych mechanizmów i, przede wszystkim, opatrzyć wyczerpującymi objaśnieniami.

W porównaniu z bardzo rozbudowaną charakterystyką wielokierunkowego działania leptyny, opis modyfikacji procesów rozrodczych poprzez interwencje żywieniowe wydaje mi się dosyć skromny. Tytuł podrozdziału 1.11.2. „Manipulacje pokarmowe” jest mało informacyjny, należałoby go uściślić w celu lepszego powiązania z treścią tej części pracy (np. „Znaczenie modyfikacji żywieniowych w programowaniu wzrostu i rozwoju”). Ustalenie potencjalnego znaczenia suplementacji żywieniowej w rozwoju zwierząt obciążonych ryzykiem zakłóconego wzrostu i opóźnionego dojrzewania płciowego jest nadrzędnym celem przedstawionej rozprawy i z uwagi na to należało bardziej szczegółowo przedstawić aktualne poglądy na temat mechanizmów i niekorzystnych następstw programowania prenatalnego.

Sformułowanie właściwego celu pracy zostało poprzedzone krótkim uzasadnieniem, w którym Autorka przypominała, przytoczone wcześniej we Wstępie, najważniejsze przesłanki do podjęcia badań. W moim przekonaniu, było to posunięcie słuszne i przydatne dla zwiększenia czytelności pracy, zwłaszcza wobec bardzo obszernego Wstępu. Dla jeszcze lepszego efektu można byłoby pominąć niektóre informacje, dotyczące np. zależności leptyna-GnRH i leptyna-LH i FSH, tym bardziej, że hormony te nie były badane w ramach rozprawy, oraz zaniechać cytowania bibliografii. W ramach jasno określonego celu pracy, Autorka sformułowała 4 zadania badawcze, które polegały na: 1. Poznaniu zależności pomiędzy osoczym stężeniem leptyny, somatotropiny, IGF-I i insuliny oraz ekspresją receptorów leptynowych w przysadce gruczołowej, a terminem pierwszej owulacji u jarek; 2. Określeniu wpływu krótkoterminowego ukierunkowanego żywienia owiec-matek w okresie ciąży i laktacji na aktywność osi somatotropowej, ekspresję receptorów leptyny w przysadce mózgowej oraz tempo przyrostów masy ciała i dojrzewania płciowego jarek kontrolnych i predysponowanych do opóźnienia dojrzewania płciowego; 3. Ustaleniu wpływu leptyny na wydzielanie hormonu wzrostu przez komórki przysadki mózgowej jarek *in vitro*; 4. Określeniu wpływu somatotropiny, IGF-I i insuliny na ekspresję długiej formy receptora leptynowego (OB-Rb) w komórkach przedniego płata przysadki mózgowej *in vitro*.

Część metodyczna pracy zajmuje 14 stron i opisuje doświadczenia prowadzone w układzie *in vivo* i *in vitro*. Tę część rozprawy otwiera podrozdział 3.1. *Odczynniki i materiały*, w którym Autorka zamieściła spis materiałów i przedmiotów nietrwałych użytych w doświadczeniach. Wykaz w przedstawionej formie jest mało przystępny i niekompletny, kolejność wymienionych produktów jest dosyć przypadkowa, nie dla wszystkich środków podano źródło ich pozyskania, a niektórych, np. próbek i pipet do hodowli komórkowych, w ogóle nie wymieniono, chociaż jest oczywiste, że były używane. W mojej opinii, odczynniki i materiały należałoby pogrupować tematycznie, wówczas spis byłby bardziej czytelny, a jego kompletność łatwiejsza do skontrolowania przez Autorkę rozprawy.

Etap pracy w układzie *in vivo* stanowiło doświadczenie przeprowadzone na maciorkach linii SCP, różniących się masą ciała i poziomem leptyny w osoczu krwi (grupy I i II), u których stwierdzono ciążę pojedynczą (grupy IS i IIS) lub mnogą-bliźniaczą (grupy IM i IIM), i które następnie poddano krótkotrwałemu żywieniu uzupełniającemu w czasie ciąży (grupy ISEP, IISEP, IMEP, IIMEP), w czasie laktacji (grupy ISL, IISL, IML, IIML) lub zarówno w czasie ciąży jak i laktacji (grupy ISEPL, IISEPL, IMEPL, IIMEPL). U jarek, będących potomstwem matek z poszczególnych grup określano: wielkość dziennych przyrostów masy ciała, moment osiągnięcia dojrzałości płciowej (pierwsza owulacja) i ekspresję długiej, funkcjonalnej izoformy receptora leptynowego Ob-Rb w przysadce

mózgowej. Zamieszczony na str. 50 schemat (Ryc. 7) bardzo ułatwia zrozumienie tego kilkietapowego i rozbudowanego doświadczenia, a zastosowane przez Doktorantkę skrócone nazwy poszczególnych grup i podgrup zwierząt są niezbędne do sprawnego i zrozumiałego opisu tej części Jej pracy. Wszystkie procedury i metody badawcze z wykorzystaniem zwierząt uzyskały akceptację II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie, wyrażoną w uchwałach nr 25/2010 i 20/2013. W rozprawie brakuje jednak kilku istotnych danych, dotyczących tego skomplikowanego doświadczenia, przeprowadzonego, łącznie, na dużej liczbie zwierząt, np. nie podano, gdzie zostało ono wykonane. W opisie części metodycznej pracy nie znalazłam również informacji o żywieniu owiec-matek w okresie poprzedzającym inseminację, co jest istotne, wobec dobrze udokumentowanego znaczenia czynników żywieniowych i metabolicznych, działających w okresie okołozapłodnieniowym (rozdział 7. *Piśmiennictwo*, poz. 154, 155 i 162), w zjawisku programowania rozwoju potomstwa. Autorka rozprawy podaje, że „*Od 6 do 10 miesiąca życia aktywność jajników monitorowano metodą laparoskopową. Pierwszą owulację stwierdzano na podstawie obecności na jajniku pierwszego ciała żółtego.*” (str. 51). Ta informacja, niepoparta dokumentacją fotograficzną, wydaje mi się nieco zdawkowa. Warto byłoby rozwinąć opis monitorowania cyklu jajnikowego, ewentualnie, zilustrować go reprezentatywnymi obrazami. Włączenie materiału dokumentującego monitorowanie wystąpienia owulacji do prezentacji rozprawy w trakcie publicznej dyskusji, byłoby cennym uzupełnieniem aktualnej wersji dysertacji. W kolejnym akapicie (ta sama str. 51) Autorka pisze, że „*Od 4-go do ukończenia 8-go miesiąca życia, w odstępach miesięcznych, każdorazowo pomiędzy godz. 8.00 a 11.00 (co 15 minut) pobierana była krew z żyły szyjnej zewnętrznej. W uzyskanym osoczu krwi analizowano stężenie leptyny, somatotropiny, IGF-I i insuliny.*” Nasuwa się pytanie, czy podjęto próbę udokumentowania wystąpienia owulacji, poprzez oznaczenie w tym materiale również innych hormonów. Z opisu tej części prac doświadczalnych nie wynika jasno, czy jagnięta, od których poubojowo pobrano przysadki mózgowe po ukończeniu 7. i 8. miesiąca życia, to były jarki, u których stwierdzono wystąpienie owulacji (str. 51).

Pewien niedosyt pozostawia również opis części eksperymentalnej pracy prowadzonej w układzie *in vitro*. Brakuje w nim informacji dotyczących szczegółowego składu pożywek doświadczalnych i kontrolnych. Nasuwa się pytanie, czy do podania hormonów *in vitro* zastosowano jakieś specyficzne rozpuszczalniki/składniki, a jeśli tak, to czy hodowle kontrolne również zostały poddane działaniu tych związków, w równoważnych stężeniach. Czy te rozpuszczalniki/związki miały wpływ na żywotność komórek? Jaki parametr kryje się pod pojęciem „wskaźnik proliferacji komórek” (str. 52, rozdział 3.2.2.), badany w warunkach przedłużającej się inkubacji w pożywce pozbawionej surowicy, co nie sprzyja proliferacji? Wynik testu MTT opartego o aktywność dehydrogenaz mitochondrialnych (Jacobson i wsp. 1994. Programmed cell death and 704 Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.* 705, 1899-910.) świadczy o natężeniu oddychania komórkowego i żywotności komórek, które mogą być obniżone przy dłuższej inkubacji bez substancji bioaktywnych. W mojej opinii, do oceny liczby komórek bardziej przydatny byłby test z fioletem krystalicznym, wiążącym się z DNA. W opisie zakładania doświadczeń na hodowlach komórek przysadki mózgowej brakuje informacji o ilości wysianych komórek. Autorka rozprawy podaje wprawdzie, że „*Zawiesinę o gęstości $2,5 \times 10^5$ żywych komórek/ml umieszczano (...) w 24-dolkowych*

plytkach.”, ale w przypadku hodowli konfluentnych gęstość wysiewanej zawiesiny ma znaczenie pomocnicze, bardziej istotna jest liczba wysianych komórek. Dopełnieniem protokołu doświadczalnego byłaby zatem informacja, jaka objętość podanej zawiesiny wysiano przy zakładaniu doświadczenia.

Otrzymane wyniki zostały opracowane i zaprezentowane w sposób bardzo czytelny. Ich sprawozdawczy opis obejmuje 62 strony, z czego połowę zajmują ryciny i tabele. Strona estetyczna prezentacji wyników zasługuje na uznanie: Doktorantka przyjęła pewną konwencję kolorystyczną, umożliwiającą sprawną identyfikację i odróżnienie grup doświadczalnych i stosuje ją konsekwentnie w całej pracy. W kolejnych podrozdziałach Autorka przedstawiła zmiany stężeń wybranych hormonów w osoczu krwi jarek, będących potomstwem matek z różnych grup doświadczalnych oraz opisała korelacje badanych parametrów. Doktorantka pisze m. in., że *„Stężenie leptyny w 8 miesiącu utrzymywało się na podobnym poziomie (...), czego konsekwencją była zachowana, u wszystkich jarek, aktywność jajników.”* Uważam to sformułowanie za niezbyt trafne, zachowana aktywność jajników była konsekwencją osiągnięcia dojrzałości płciowej, a nie wyższego poziomu leptyny. U większości badanych jarek wzrost poziomu leptyny w osoczu krwi był zbieżny w czasie z wystąpieniem pierwszej owulacji, nie był on jednak warunkiem wystarczającym, o czym świadczy brak stwierdzonej owulacji przy ponadfizjologicznych stężeniach leptyny w osoczu krwi jarek z grup IIMC i IIMEP. Pewne zastrzeżenia budzą ryciny, w których opisie brakuje informacji o liczbie „surowych danych” (n), które posłużyły do obliczenia zaprezentowanych wartości średnich \pm SD. Rozmieszczenie niektórych literowych oznaczeń różnic statystycznych na rycinach 10-12 jest niejasne, ponieważ nie pokrywa się z przebiegiem linii na wykresie.

W podrozdziale 4.1.2.1. (str. 68) Doktorantka podaje, że *„Najwyższy poziom ekspresji mRNA OB-Rb w przysadkach gruczołowych stwierdzono we wszystkich badanych podgrupach po ukończeniu 6 miesiąca życia (...). W 7 miesiącu życia, w okresie wystąpienia pierwszej owulacji, stwierdzono obniżenie poziomu ekspresji mRNA OB-Rb (...).”* Trudno jest zgodzić się z powyższym stwierdzeniem, ponieważ średnie wartości dla 6. i 7. miesiąca życia nie różnią się istotnie (Ryc. 13). Można jedynie wskazać na pewną tendencję spadkową, nasuwa się również pytanie o biologiczne znaczenie obniżenia ekspresji receptora o 6-12%. Oznaczenia istotności statystycznych na Rycinach 14-16 budzą wątpliwości. Powstaje pytanie o interpretację statystyczną oznaczenia „a,b” i „b,c”. Na rycinę 17 prawdopodobnie wkraść się błąd: nie jest jasne, dlaczego nad słupkiem wartości średnich dla 5. miesiąca życia jarek urodzonych przez matki z grupy ISC zaznaczono „ab”. Na tej samej rycinie pojawia się pewna niekonsekwencja w oznaczeniach statystycznych: w grupie ISC „a” oznacza niższą wartość, a „b” – wartości wyższe, podczas gdy w grupach ISEP, ISEPL, i ISEL jest odwrotnie. Podobna przypadkowość literowych oznaczeń istotności statystycznych występuje na rycinach: 18 (str. 81), 20 (str. 83), 21 (87), 22 (str. 88) i 24 (str. 90), gdzie kolejne litery alfabetu w obrębie jednej podgrupy są przyporządkowane do wartości średnich rosnąco, a w innych podgrupach – malejąco. Ujednolicenie zasady użycia tych oznaczeń byłoby korzystne dla spójności pracy.

W podrozdziale 4.1.6. ponownie pojawiają się niefortunne sformułowania sugerujące bezpośredni związek między wzrostem masy ciała, a wystąpieniem pierwszej owulacji (str. 99-101). Nasuwa się również pytanie, czym różnią się dane zebrane w Tabeli 1 od wartości

przedstawionych na Rycinach 29-32. Na Rycinie 31 nieprecyzyjnie zaznaczono podgrupy jarek, u których ok. 240. dnia życia wystąpiła pierwsza owulacja.

W rozdziale 4.2. rozprawy Autorka opisała wyniki doświadczeń przeprowadzonych w układzie *in vitro* na kulturach owczych pierwotnych komórek części gruczołowej przysadki mózgowej. Ryciny zawarte w tej części pracy są czytelne, drobne zastrzeżenia mogą budzić tytuły osi rzędnych, uwzględniające godziny prowadzonych pomiarów, co jest zbędne, ponieważ wpływ czasu na badane parametry ilustrują linie w różnych kolorach. Zauważyłam pewne rozbieżności między opisem i treścią rycin, np. informacja podana w podrozdziale 4.2.3.1. (str. 118): „*Najwyższe z zastosowanych stężeń 10-6 i 10-5 M, powodowały obniżenie poziomu ekspresji mRNA OB-Rb przez cały okres doświadczenia.*” nie znajduje potwierdzenia w danych przedstawionych na Rycinie 36, ponieważ przy wartościach średnich badanego parametru, uzyskanych dla najwyższych zastosowanych stężeń hormonu nie zamieszczono oznaczeń istotności statystycznej. Podobne zastrzeżenia budzi niezgodność pomiędzy informacją, dotyczącą wpływu najwyższych badanych stężeń IGF-I (podrozdział 4.2.3.2.) a wartościami zaprezentowanymi na Rycinie 37.

Rozdział 5. *Dyskusja* zajmuje 14 stron i został podzielony na części, które pod względem treści korespondują z kolejnymi podrozdziałami *Wyników*. Autorka w syntetyczny sposób omówiła najważniejsze wyniki uzyskane w toku realizacji planu badawczego pracy doktorskiej oraz podjęła próbę interpretacji poczynionych spostrzeżeń. Porównała własne wyniki z rezultatami opublikowanych wcześniej badań i z dużą dojrzałością zmierzyła się z brakiem jednoznacznych i spodziewanych zależności między niektórymi badanymi wskaźnikami oraz z rozbieżnościami między własnymi i opublikowanymi obserwacjami. W moim odczuciu, dobrym uwieńczeniem *Dyskusji* byłoby jej krótkie podsumowanie, w formie tekstu lub syntetycznego schematu uwzględniającego najważniejsze osiągnięcia zaprezentowane w rozprawie. Lektura tej części pracy byłaby łatwiejsza, gdyby Autorka zastosowała w tekście odwołania do własnych wyników, przy ich omawianiu.

W oparciu o uzyskane wyniki doświadczeń Doktorantka sformułowała 10 wniosków. Ten rozdział rozprawy budzi pewne zastrzeżenia, w mojej opinii, wnioski są zbyt liczne, niepotrzebnie rozdrobnione, miejscami powtarzające się w treści. Na przykład, wnioski 4., 5. i 6. nawiązują do wniosku 1. i powinny być przedstawione, jako jego rozwinięcie. Wnioski 2. i 3. dotyczą wpływu suplementacji żywieniowej na badane parametry wzrostu i dojrzewania płciowego i powinny być przedstawione łącznie. Wnioski 7., 9. i 10. są powtórzeniem wyników przeprowadzonych obserwacji. Wniosek 8. nie jest poparty wynikami opisanymi w rozprawie, ponieważ nie przedstawiono dowodu na hamowanie ekspresji receptora Ob-Rb w prowadzonych doświadczeniach. Wniosek jest w istocie domniemaniem mechanizmu regulującego wydzielanie GH na poziomie komórek części gruczołowej przysadki mózgowej, opartym, w dużej mierze, na danych bibliograficznych, m. in. wcześniejszych badaniach zespołu, w którym działa Doktorantka.

Rozdział 7. *Piśmiennictwo* jest obszerny, obejmuje 237 pozycji, z których większość (152) ukazała się po 2000 r. Wykorzystane materiały źródłowe zostały dobrane właściwie, dostarczają obszernej wiedzy z zakresu fizjologii, endokrynologii, medycyny, zootechniki, biologii komórki, biologii molekularnej i genetyki, co potwierdza interdyscyplinarne znaczenie podjętej tematyki badawczej.

Uwagi szczegółowe

- W streszczeniach brakuje jasno wyodrębnionych wniosków oraz próby przeniesienia uzyskanych wyników na sytuację *in vivo*.

- Niezręczności i drobne błędy językowe: str. 17 i wszystkie ryciny (z wyjątkiem Ryc. 8) – Opis umieszcza się pod ryciną, a nie nad nią; str. 18, 1. zdanie – zamiast „finalnie”, powinno być „ostatecznie”; str. 26, rozdział 1.7., 4. zdanie – zamiast „jego” powinno być „jej” (leptyny); str. 27, rozdział 1.8. – przedostatnie zdanie jest niejasne, niezbyt trafne wydaje się również nazwanie leptyny „związkiem” (podobnie nazwano grelinę na str. 31); str. 29, 1. zdanie – zamiast „związane jest”, lepiej byłoby „skutkuje”; str. 30, rozdział 1.10 – konstrukcja słowna „dojrzewanie oocytów przez swoiste receptory” nie jest właściwa; str. 46 – zdanie „Program badawczy podzielony został na dwa etapy: pierwszy zrealizowany w warunkach *in vivo*, drugi - w warunkach *in vitro*.” powinno być zamieszczone przed podrozdziałem 3.2.1., a nie w jego obrębie; str. 61 – niezręczność językowa w tytule podrozdziału: „...osoczowym stężeniem leptyny w osoczu krwi...”; ; str.72, opis Ryciny 13 – Na rycinie nie występuje litera „b”, nie ma zatem potrzeby wyjaśniania jej znaczenia; str. 102, opis Tabeli 1 – Sformułowanie „masy ciała skorelowane z wystąpieniem pierwszej owulacji” jest niewłaściwe, powinno być np. „masy ciała w momencie wystąpienia pierwszej owulacji”; rozdział 7. Piśmiennictwo – drobne błędy edytorskie w zapisie danych bibliograficznych pozycji: 38, 45, 77, 119, 155, 156, 157, 158.

Ocena rozprawy doktorskiej

Przechodząc do oceny merytorycznej przedstawionej rozprawy należy, przede wszystkim, podkreślić jej ambitny cel, jakim było ustalenie wpływu krótkoterminowego ukierunkowanego żywienia owiec-matek na wybrane parametry warunkujące proces dojrzewania płciowego potomstwa. Badania ujęte w harmonogramie pracy przeprowadzono w ramach projektu finansowanego przez MNiSW/NCN (nr NN308598439), co dodatkowo przemawia za ich wartością naukową. Na uznanie zasługuje wybór modelu badawczego, na którym przeprowadzono doświadczenia: znalazły się w nim grupy zwierząt predysponowane do opóźnienia dojrzałości płciowej, czyli pochodzące z mnogiej ciąży lub urodzone przez otyłe matki, jak również grupy zwierząt obciążonych podwójnym ryzykiem zaprogramowania zaburzeń wzrostu somatycznego i dojrzewania płciowego (ciąża mnoga otyłych matek). Model ten może z powodzeniem służyć do dalszych badań, ponieważ został uwiarygodniony obserwacjami poczynionymi przez Doktorantkę, takimi, jak: a) różnice w masie urodzeniowej jagniąt będących potomstwem matek z różnych grup doświadczalnych (najniższa masa urodzeniowa u jarek z grupy „podwójnego ryzyka” wystąpienia zaburzeń w dojrzewaniu płciowym); b) różnice w przyrostach masy ciała u potomstwa matek z różnych grup (największe przyrosty w późniejszym okresie obserwacji u jarek z grupy „podwójnego ryzyka” wystąpienia ww zaburzeń); c) opóźnienie inicjacji dojrzałości płciowej u jagniąt pochodzących z ciąży mnogiej lub od otyłych matek (największe opóźnienie – u jarek obciążonych podwójnym ryzykiem wystąpienia zaburzeń); d) prawidłowa dodatnia korelacja między osoczowymi stężeniami somatotropiny i IGF-I.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę stanowią cenny wkład do wiedzy dotyczącej znaczenia leptyny w regulacji procesów związanych z osiągnięciem dojrzałości płciowej. W toku realizacji pracy ustalono, że wzrost osoczowego stężenia leptyny w zakresie

fizjologicznym jest zbieżny w czasie z osiągnięciem dojrzałości płciowej. Z drugiej strony, ponadfizjologicznym stężeniom leptyny, związanym z dużą masą ciała i tkanki tłuszczowej towarzyszy opóźnienie lub zahamowanie owulacji, które przynajmniej częściowo można wyjaśnić zmniejszoną wrażliwością na leptynę na poziomie przysadki mózgowej. Brak wyraźnych zależności między osoczymi stężeniami somatotropiny i IGF-I a osiągnięciem dojrzałości płciowej wskazuje, że zmiany tych hormonów w zakresie ich fizjologicznych stężeń mają drugorzędne znaczenie dla wystąpienia owulacji w zastosowanym modelu doświadczalnym. Pozorna rozbieżność między opublikowanymi danymi a niektórymi obserwacjami przedstawionymi w niniejszej rozprawie nie umniejsza jej walorów poznawczych, stanowi nieodłączny element złożonych układów biologicznych i modeli doświadczalnych, dojrzałego naukowca skłania do stawiania kolejnych hipotez, toruje drogę przyszłym badaniom.

Opisane w rozprawie obserwacje mają dużą wartość praktyczną, bowiem wskazują na możliwość przyspieszenia osiągnięcia dojrzałości płciowej potomstwa poprzez krótkotrwałe żywienie uzupełniające matek w okresie laktacji i podniesienia wartości PRKA ich mleka. Zastosowana procedura suplementacji żywieniowej okazała się skuteczna zwłaszcza w przypadku jarek narażonych na oba czynniki ryzyka opóźnienia wzrostu i dojrzewania płciowego.

Kolejnym atutem zaprezentowanej rozprawy jest jej duża różnorodność metodyczna. Do wykonania analiz zastosowano m. in. metody: wysokosprawnościowej chromatografii cieczowej (oznaczanie 17- β -estradiolu i progesteronu w osoczu krwi), immunoenzymatyczną (oznaczanie stężeń leptyny, GH, IGF-I i insuliny w osoczu krwi i/lub podłożu hodowlanym *in vitro*), radioimmunologiczną (oznaczanie stężeń leptyny w osoczu krwi), oraz optyczną spektrometrię emisyjną (oznaczanie stężeń jonów w mleku), izolację i hodowlę *in vitro* komórek części gruczołowej przysadki mózgowej, technikę PCR w czasie rzeczywistym, testy kolorymetryczne oceny żywotności i aktywności metabolicznej komórek w kulturach *in vitro*. Ponadto Autorka przeprowadziła analizy korelacji i w większości przypadków wykazała silne związki pomiędzy badanymi wskaźnikami, co ułatwiło interpretację uzyskanych wyników. Nowoczesna i zróżnicowana metodyka badawcza zapewnia wiarygodność i wartość poznawczą opisanych doświadczeń.

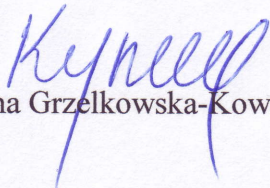
Obserwacje dotyczące bezpośredniego działania hormonów (leptyna, GH, IGF-I, insulina) na komórki części gruczołowej przysadki mózgowej *in vitro* wzbogacają wiedzę o endokrynnych mechanizmach regulujących jej aktywność wydzielniczą. Stwierdzenie zależnego do stężenia wpływu badanych hormonów na ekspresję receptora leptynowego Ob-Rb w kulturach komórek przysadki pozwala wysnuć wniosek, że wrażliwość części gruczołowej przysadki mózgowej na leptynę jest ważnym elementem integracji obwodowych sygnałów związanych z procesami somatycznego wzrostu (GH, IGF-I) oraz ze statusem energetycznym i metabolicznym organizmu (insulina). Słabszą stroną tej części pracy jest doświadczenie, w którym badano potencjalne interakcje ACTH-leptyna w regulacji wydzielania somatotropiny. W moim przekonaniu, założenie o hamującym wpływie ACTH na ekspresję receptora leptynowego Ob-Rb jest niewystarczające, powinno być poparte analizą na poziomie transkryptu *Ob-Rb* (PCR w czasie rzeczywistym) lub jego produktu białkowego (immunoblotting), w danym układzie doświadczalnym. Przebieg zmian wydzielania somatotropiny do pożywki inkubacyjnej przy wyższych stężeniach leptyny

i w obecności ACTH jest złożony i wyraźnie sugeruje: a) istnienie mechanizmu niezależnego od hamowania receptora leptynowego, lub b) synergizm w działaniu obu czynników, lub c) efekt nieswoisty, a pewne światło na tę kwestię mogłyby rzucić wyniki doświadczenia nad wpływem samego ACTH na wydzielanie GH, ale takich badań nie przedstawiono.

Wniosek końcowy

Podsumowując ocenę przedstawionej rozprawy doktorskiej należy podkreślić jej mocne strony, takie jak: jasno sformułowana hipoteza badawcza, dążenie do jej weryfikacji przy użyciu różnorodnych metod, starannie przedstawione wyniki oraz ich autorska, spójna interpretacja. Praca wskazuje na rozległą wiedzę teoretyczną Doktorantki, opanowanie przez Nią współczesnego warsztatu badawczego, umiejętność pracy w zespole oraz zdolność do samodzielnego realizowania zadań naukowych. Przedstawione w recenzji uwagi i komentarze dotyczą niedociągnięć powstałych na etapie ostatecznego raportu z przeprowadzonych badań i nie umniejszają walorów poznawczych i praktycznych wykonanej pracy.

Na podstawie dokonanej oceny stwierdzam, że przedstawiona praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r., o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Z pełnym przekonaniem przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o podjęcie dalszych czynności w przewodzie doktorskim mgr Katarzyny Witkowskiej. Jednocześnie, ze względu na duży wysiłek badawczy zmierzający do realizacji ambitnego celu oraz wartość poznawczą i praktyczną uzyskanych wyników zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału z prośbą o rozważenie wyróżnienia przedstawionej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.


Katarzyna Grzelkowska-Kowalczyk