

dr hab. Michał Dziecioł prof. UPWR
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Katedra Rozrodu z Kliniką
Zwierząt Gospodarskich

Wrocław, 20 lutego 2022 roku

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lekarza weterynarii Marii Chmurskiej-Gąsowskiej nt. "Stężenie hormonów tarczycy (TH) w przebiegu ciąży u królika domowego (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*)".

Opinię wykonano na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 16 grudnia 2021 roku.

Praca pod opieką promotora dr hab. Iwony Taszkun oraz promotora pomocniczego dr n. wet. Jarosława Wieczorka została wykonana w Uniwersyteckim Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR, z wykorzystaniem zwierząt ze Stacji Doświadczalnej Katedry Genetyki, Hodowli i Etologii Zwierząt w Przegorzałach.

Królik domowy (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) stanowi udomowioną formę królika europejskiego (*Oryctolagus cuniculus*) i należy do zajęczaków z rodziny zajęcowańców. Jest hodowany dla mięsa, skór, wełny i futra. Uważa się, że po raz pierwszy udomowiony został w Hiszpanii, kraju, który oprócz Francji i Woch do tej pory pozostaje światowym (a w każdym razie europejskim) liderem produkcji mięsa króliczego. Oprócz utrzymywania królika jako zwierzęcia hodowlanego oraz domowego (towarzyszącego), króliki wykorzystuje się w wielu ośrodkach naukowych jako zwierzęta laboratoryjne. W toku licznych doświadczeń króliki używane są do takich celów jak produkcja przeciwciał, szczepionek, testowanie preparatów przeciwpasożytniczych, badania nad astmą oskrzelową, udarami mózgu, mukowiscydozą, cukrzycą, nowotworami, a ponadto w badaniach toksykologicznych oraz w badaniach endokrynologicznych, w tym badaniach dotyczących przebiegu ciąży i funkcjonowania łożyska.

Coraz częściej również, w mieszkaniach prywatnych właścicieli oprócz królików (głównie ras miniaturowych) zakupionych tradycyjnie w sklepie zoologicznym, można znaleźć zwierzęta pochodzące z laboratoriów. Wynika to z dużego zaangażowania licznych organizacji pro-zwierzęcych, dbających o umożliwienie zwierzętom „nieprzydatnym” do dalszych badań, na uzyskanie szansy, na dokończenie życia w warunkach zgoła odmiennych od laboratoryjnych. Wśród tych egzemplarzy znajdują się również króliki wykorzystywane do badań endokrynologicznych, w tym badań nad funkcjonowaniem tarczycy.

Pomimo faktu, iż w przeciwieństwie do różnych, czasem bardzo egzotycznych, a przez to przejściowo lub trwale modnych gatunków, królik domowy jest zwierzęciem od lat towarzyszącym człowiekowi, niektóre kwestie dotyczące jego fizjologii pozostają nie do końca poznane, przez co terapia części schorzeń może napotykać trudności już na etapie diagnozowania. Dzieje się tak np. w przypadku schorzeń tarczycy. Jak się okazuje, w tej kwestii literatura fachowa nie dostarcza wystarczających danych (np. pełnego zestawu referencyjnych wartości parametrów diagnostycznych związanych z funkcjonowaniem gruczołu tarczowego), zmuszając lekarza praktyka do działania nieco na ślepo, co z pewnością nie przyczynia się do efektywnego diagnozowania i leczenia obserwowanych zaburzeń.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest obszerna, obejmuje 166 stron maszynopisu, posiada klasyczny układ dla tego typu opracowań z następującymi rozdziałami: wstęp, cel badań, materiał i metody, analiza statystyczna wyników, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, a ponadto schematy, tabele, ryciny oraz fotografie. Ponadto w początkowej części umieszczono wykaz skrótów zastosowanych w pracy, a w końcowej części pracy znajdziemy karty badania klinicznego królic wykorzystanych w doświadczeniu oraz tabele wyników badań laboratoryjnych krwi królic z zaznaczonymi różnicami statystycznymi pomiędzy rasami.

W obszernym wstępie Doktorantka opisuje bardzo szczegółowo funkcjonowanie osi podwzgórzowo-przysadkowo-tarczycowej (regulację biosyntezy, wydzielania hormonów tarczycy oraz transport), umieszczając ją w sieci połączeń metabolicznych z innymi narządami oraz uwzględniając modyfikujący wpływ środowiska zewnętrznego (oddziaływanie np. melatoniny itp.). Następnie Doktorantka przechodzi do omówienia zagadnień istotnych ze względu na tematykę pracy, a więc opisu znanych zależności hormonów tarczycy w kontekście ciąży, opierając się w znacznym stopniu na informacjach dotyczących innych gatunków. W kolejnych podrozdziałach znajdujemy opis wpływu

hormonów tarczycy na płody oraz odniesienie do istotnej w kontekście rozrodu u królika kwestii toksemii ciążyowej. Ponadto Doktorantka umiejscawia pozycję królika domowego jako zwierzę towarzyszące i hodowlane oraz podkreśla cechy, które sprawiają, iż jest on gatunkiem niezwykle przydatnym w badaniach eksperymentalnych, szczególnie tych dotyczących przebiegu ciąży i funkcjonowania łożyska. Ostatnim akcentem zawartym we wstępie jest opis zaburzeń tarczycy u królików, który ostatecznie zbliża nas do głównego tematu pracy, podkreślając jednocześnie, iż pomimo postępu medycyny weterynaryjnej w kontekście diagnostyki i leczenia różnych schorzeń u królika domowego, zaburzenia funkcjonowania tarczycy wciąż nie doczekały się pełnych i rzetelnych opracowań, co w sposób trafny uzasadnia podjęcie przez Doktorantkę badań z tego zakresu.

Jako cel badań, które z założenia miały mieć zarówno aspekt poznawczy jak i aplikacyjny, Doktorantka wskazała określenie wpływu tyreotropiny i hormonów tarczycy na przebieg ciąży, jak również wyznaczenie przesiewowego wskaźnika laboratoryjnego związanego ze stopniem ryzyka wystąpienia tzw. toksemii ciążyowej oraz przypadkami padnięć ciężarnych samic wywołanych dysfunkcją tarczycy. Proponowany cel miał być realizowany głównie poprzez wykonanie szeroko zakrojonych badań laboratoryjnych (obejmujących badania hematologiczne, biochemiczne oraz endokrynologiczne), na dojrzałych płciowo samicach dwóch ras królika domowego. Dodatkowo zaplanowano przeprowadzenie obserwacji mających na celu oceną plenności oraz masy urodzeniowej miotów i powiązanie tych parametrów z jakością funkcjonowania gruczołu tarczowego.

W rozdziale trzecim recenzowanej dysertacji, Doktorantka szczegółowo i skrupulatnie opisała materiały oraz metody, jakie zostały wykorzystane do realizacji zaplanowanego celu badawczego. Badania przeprowadzono w okresie letnim, na 12 samicach ras popielańskiej białej oraz termondzkiej białej (po 6 sztuk z każdej rasy). Na zaplanowane w projekcie procedury Doktorantka uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej. Kwalifikacja samic do doświadczenia odbyła się na podstawie szczegółowego badania klinicznego opartego o wyniki badań uzyskanych z ankiet przygotowanych na podstawie wytycznych The Royal School of Veterinary Studies Uniwersytetu w Edynburgu.

Materiał do badań w postaci krwi pobierany był od wszystkich samic o tej samej porze dnia (co w przypadku badania aktywności hormonów jest istotnym czynnikiem), a sekwencja pobierania próbek obejmowała trzykrotne pobranie materiału: trzy dni przed kryciem, w piętnastym dniu ciąży oraz w końcowej fazie ciąży (28 dniu). Biorąc pod uwagę długość trwania ciąży u królic wydaje się, że zaproponowany schemat był trafny i pozwolił na uzyskanie przekrojowych wyników analiz. Ponadto realizując dodatkowe cele nakreślone w

poprzednim rozdziale po wykocie wykonywano ocenę miotu (liczba, masa urodzeniowa oraz przeżywalność w pierwszej dobie noworodków).

Badania laboratoryjne obejmowały badanie morfologiczne krwi żyłnej, wraz z rozdziałem frakcji leukocytarnej (limfocyty, monocyty, heterofile, eozynofile oraz bazofile), badanie biochemiczne surowicy (aminotransferazy asparaginianowej, aminotransferazy alaninowej, fosfatazy zasadowej, glukozy, mocznika, kreatyniny, cholesterolu całkowitego, białka całkowitego, albumin, globulin, wapnia oraz fosforu). Opisane powyżej profile miały stanowić tło dla głównej części badań jakimi były badania stężenia hormonów związanych z funkcjonowaniem tarczycy: tereotropiny (TSH) (badanie metodą ELISA), całkowitej tyroksyny (tT4), wolnej tyroksyny (fT4,) całkowitej trijodotyroniny (tT3) oraz wolnej trijodotyroniny (fT3) (badanie metodą radioimmunologiczną /RIA/). W pracy Doktorantka szczegółowo opisała zarówno składniki wchodzące w skład zestawów, zasadę metody, jak również udokumentowała w dalszych częściach maszynopisu sprzęt i stosowane zestawy przy pomocy fotografii.

W kolejnym etapie Doktorantka opisała metody statystyczne wykorzystane do analizy zgromadzonych w toku badań licznych danych. Wyniki analizowano z użyciem testu Friedmana wraz z testem post-hoc używając programu Statistica 13.34 przy poziomie istotności $\alpha=0,05$. W celu oceny, występowania różnic istotnych statystycznie pomiędzy rasami wykorzystano test U Manna-Whitneya, przy wartości odcięcia na poziomie 0,05. Ocenę siły korelacji przeprowadzono z wykorzystaniem skali Guillforda.

Wyniki opisano w kolejnym rozdziale, w którym część rezultatów została przedstawiona również w postaci czytelnych i dobrze opisanych 12 tabel oraz 16 rycin. Jednym z od razu rzucających się spostrzeżeń z całą pewnością jest obserwowany w przypadku większości badanych parametrów brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy rasami. Ponadto w większości przypadków badanych parametrów hematologicznych jak również biochemicznych u badanych samic rezultaty pozostawały w granicach norm podawanych przez literaturę tematu, choć odnotowywano również zmiany w zależności od terminu badania (np. AST, AP)

Ciekawe obserwacje zanotowano w zakresie, który stanowił główny trzon badań Doktorantki, a mianowicie w zakresie zmian poziomów hormonów. Ponieważ podobnie jak w przypadku większości pozostałych parametrów nie stwierdzono różnic wynikających z przynależności do różnych ras, analizę hormonów tarczycy przeprowadzono na połączonej stawce królic (n=12). Wykazano stabilne zachowanie wolnej tyroksyny w przebiegu ciąży. Natomiast wolna trijodotyronina wzrastała u obu ras do połowy ciąży, aby później spaść

poniżej poziomu wyjściowego (Badnie I). Doktorantka stwierdziła spadek stężenia tT3 i tT4 w przebiegu ciąży i postawiła hipotezę wiążącą ten spadek z obniżeniem stężenia białka i jego frakcji. Jednakże w przypadku hormonu tyreotropowego, u samic rasy termondzkiej stwierdzono występowanie różnic statystycznie istotnych pomiędzy kolejnymi badaniami, czego nie wykazano u rasy popielniańskiej. Nie wykazano jednak różnic statystycznie istotnych pomiędzy rasami w poszczególnych badaniach.

Analiza wyników poziomu wolnej trijodotyroniny wykazała z kolei wzrost wartości stężenia fT3 w połowie ciąży obserwowanej w obrębie całej grupy, a więc przy braku różnic pomiędzy rasami oraz istotne różnice (spadek) pomiędzy badaniem II i III.

Wspomniana wcześniej zbliżona dynamika zmian stężenia hormonów tarczycy u wszystkich samic wykorzystywanych w doświadczeniu skłoniła Doktorantkę do przeprowadzenia analiz korelacji pomiędzy badanymi hormonami dla wszystkich samic łącznie (n=12), bez podziału na rasy. Uzyskane w ten sposób wyniki analiz korelacji dla hormonów TSH, tT4, fT4, tT3 oraz fT3 w kolejnych badaniach u wszystkich królic wykazały występowanie bardzo wysokiej korelacji dodatniej pomiędzy tT3 i fT3 przed ciążą i w zaawansowanej ciąży. W tym ostatnim okresie wykazano również wysoką korelację dodatnią pomiędzy tT4 i tT3.

Analizując wyniki swoich badań w kontekście występowania korelacji pomiędzy TSH i hormonami tarczycy a liczebnością miotu, Doktorantka wykazała występowanie wysokiej korelacji dodatniej pomiędzy liczbą potomstwa a stężeniem hormonu tT4 w surowicy samicy w badaniu I. Z kolei w połowie ciąży zaobserwowano wysoką ujemną korelację pomiędzy uzyskaną liczbą potomstwa, a stężeniem fT3 u ciężarnych samic. Ponadto stwierdzono bardzo wysoką ujemną korelację pomiędzy stężeniem fT3 w trzecim badaniu, a liczbą uzyskanego potomstwa.

Uzyskane w trakcie badań wyniki zostały omówione w Dyskusji, w odniesieniu do rezultatów innych badaczy, jak również w kontekście analogicznych badań przeprowadzanych na innych gatunkach zwierząt oraz u ludzi. Konkluzje zostały zebrane w kolejnej części dysertacji i przedstawione w postaci czterech wniosków.

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska porusza istotne kwestie, bo wypełniające lukę w wiedzy podstawowej, a jednocześnie daje nowe narzędzia lekarzom praktykom w diagnozowaniu i monitorowaniu przebiegu ciąży u królika domowego. Rozprawa napisana jest w sposób zwarty i uporządkowany. Jej treść świadczy o tym, że Doktorantka dysponuje dużym zasobem wiedzy i ma dobrze opanowany warsztat badawczy.

Jednakże mimo generalnie pozytywnej oceny tej pracy, z obowiązku recenzenta pragnę wskazać na następujące usterki:

- W rozdziale Wyniki, Doktorantka pisze o stężeniu tT4 w surowicy ciężarnej samicy w badaniu I. Z opisu metodyki wynika jednak, iż badanie pierwsze dotyczyło samic przed kryciem, a więc nieciążarnych.
- W dyskusji (str. 86) Doktorantka pisze: „W moich badaniach stężenie TSH w surowicy u 12 samic ciężarnych przed ciążą i w połowie jej trwania istotnie wzrastało”. Wydaje mi się, że ten wniosek powinien być przeformułowany i brzmieć np. tak: W moich badaniach stężenie TSH w surowicy u 12 samic ~~ciężarnych~~ (ewentualnie- badanych) przed ciążą i w połowie jej trwania istotnie wzrastało
- Str. 30 „jest jest” powtórzenie
- str.83- co miała na myśli Doktorantka pisząc, że poziom ALT był bardziej labilny- wymagało by to moim zdaniem doprecyzowania, bardziej szczegółowego omówienia w Dyskusji, podobnie jak w przypadku pozostałych parametrów.
- Mam również pewne zastrzeżenia do sposobu sformułowania wniosków:
 - We wniosku pierwszym czytamy, że „Dodatkowo wykazana **w przed** ciążą i w jej trakcie...”,
 - We wniosku trzecim „...mogą stanowić składowe panelu badań laboratoryjnych oceniający ogólny stan zdrowia...” . Moim zdaniem, bardziej prawidłowo brzmiało by np. ...mogą stanowić składowe panelu badań laboratoryjnych, przydatnego w ocenie ogólnego stanu zdrowia...”
 - Wniosek 2. Skąd wniosek o przydatności analizy poziomu fT3 do oceny stopnia ryzyka wystąpienia toksemii ciąży, skoro nie zaobserwowano takiego przypadku w przebiegu eksperymentu? Wyniki uzyskane w badaniach Doktorantki wykazały, że stężenie fT3 było najbardziej labilnym parametrem, wzrastającym w połowie ciąży, a następnie spadającym pod koniec tego okresu, nawet do wartości niższych niż przed ciążą. Jednak nie dostrzegam jasnego związku z przypadkami toksemii, nie zaobserwowano bowiem występowania tego schorzenia u badanych samic. Czy jest więc to wniosek wpływający z przeprowadzonych badań? Co więcej takiego związku nie wskazała Doktorantka również we wstępie swojej pracy gdzie opisywała to schorzenie. Wg informacji zawartych we wstępie, ani wiek (predysponowane są pierwiastki, a w doświadczeniu wykorzystano wieloródki), ani rasa samic

wykorzystanych w badaniach, nie predysponowała ich do wystąpienia tego schorzenia. We wstępie nie ma też jakichkolwiek odniesień do tarczycy i hormonów związanych z jej funkcjonowaniem w kontekście toksemii ciąży. Jedynym sugerowanym połączeniem zaburzeń o charakterze endokrynologicznym łączącym je z zaburzeniami metabolicznymi mogącymi przyczynić się do rozwoju zatrucia ciążowego jest przytaczana przez Doktorantkę hipoteza Greena (1938), która jednak nie doczekała się dalszych badań.

- o Analogicznie moje wątpliwości budzi również wniosek 4, w którym oprócz opisanego stabilnego poziomu TSH w przebiegu ciąży, Doktorantka konstatuje, iż analiza tego parametru nie jest przydatna do oceny stopnia ryzyka wystąpienia toksemii ciąży u królic. Moim zdaniem można by tak stwierdzić, gdyby ten parametr pozostawał stabilny również w przypadkach toksemii- takich jednak przypadków nie odnotowano w przedstawionym doświadczeniu.

Pomimo jednak przedstawionych uwag, co do których Doktorantka będzie mogła się odnieść podczas publicznej rozprawy i które moim zdaniem nie obniżają znacząco merytorycznej wartości pracy jako całości, stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska przedstawia znaczne wartości aplikacyjne, a otrzymane wyniki, przedstawiony przegląd literatury i dyskusja istotnie wzbogacają wiedzę naukową w tej dziedzinie badań.

W związku z tym uważam, że rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i stanowi podstawę do nadania stopnia naukowego doktora.

Przedkładam zatem wniosek Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie pracy i dopuszczenie lekarza weterynarii Marii Chmurskiej-Gąsowskiej do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Dr hab. Michał Dziecioł

