Kraków, 22.12.2014

dr hab. Małgorzata Duda
Zakład Endokrynologii
Instytut Zoologii
Uniwersytet Jagielloński
30-387 Kraków, ul. Gronostajowa 9
tel. +48 12 664 50 32
e-mail: maja.duda@uj.edu.pl

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii
i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Endokrynologii

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kirsz

pt. "Oddziaływanie fotoperiodu na interakcje pomiędzy wybranymi hormonami zaangażowanymi w utrzymanie homeostazy energetycznej u owiec".

Praca została wykonana w Katedrze Biotechnologii Zwierząt
Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
pod kierunkiem Prof. dr hab. Doroty Zięby-Przybylskiej

W ciągu ostatniej dekady wzmocnił się pogląd, przypisujący kluczowe znaczenie złożonym zależnościom pomiędzy ośrodkowym układem nerwowym (OUN), a funkcjonowaniem wielu narządów w szeroko pojętej homeostazie energetycznej. Wymaga to przekazywania do ośrodków mózgowych informacji o aktualnym stanie energetycznym organizmu. Szczególnie ważną rolę w tym procesie odgrywają sygnały hormonalne. Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Katarzyny Kirsz dotycząca jednego z intensywniej badanych w ostatnich latach zagadnień, składa się z dwóch odrębnych części odnoszących się do wpływu warunków świetlnych na kształtowanie zależności pomiędzy sekrecją wybranych hormonów, a gospodarką energetyczną u owiec. W pierwszej części obejmującej doświadczenia przeprowadzone w warunkach tak *in vivo* jak *in vitro*, ukazano wpływ fotoperiodu na wzajemne oddziaływania pomiędzy sekrecją leptyny, oreksyny B i greliny. Druga część pracy poświęcona została poznaniu roli leptyny, oreksyny A i greliny w kształtowaniu aktywności osi gonado- i somatotropowej. Ponadto, prześledzono wpływ leptyny i sezonu rozrodczego owiec na kształtowanie powyższych zależności. Badania te w części *in vivo* obejmowały dokomorowe podanie czynników doświadczalnych czyli leptyny, oreksyny A lub B, antagonisty receptora leptyny (SOLA lub

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii
i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Endokrynologii

SLAN-3) w kombinacji z oreksyną B lub greliną. W części prowadzonej w warunkach *in vitro* inkubowano eksplanty szyszynki (adaptacja metody hodowli narządowej Trowell'a - na granicy faz) w pożywce hodowlanej z dodatkiem czynników stosowanych w części doświadczalnej prowadzonej w warunkach *in vivo*. W obu modelach doświadczalnych analizie poddano wpływ różnych dawek podawanych czynników oraz wpływ fotoperiodu, na uwalnianie badanych białek do krwi lub medium hodowlanego przy zastosowaniu radioimmunologii oraz metody immunoenzymatycznej.

Mimo zaangażowania dużej grupy badaczy oraz wieloletnich zmagań ukierunkowanych na poznanie mechanizmów determinujących stan równowagi energetycznej organizmów, zagadnienia te nie są ciągle w pełni poznane. W ostatnich latach, szczególnie wiele uwagi poświęca się zarówno interakcji pomiędzy nerwowymi i hormonalnymi szlakami regulującymi łaknienie jak ogniwami łączącymi gospodarkę energetyczną organizmu z zaburzeniami funkcji rozrodczych tak zwierząt jak ludzi. Z tych powodów, zagadnienia poruszane przez Doktorantkę w jej pracy doktorskiej są aktualne i godne uwagi.

CHARAKTERYSTYKA PRACY I UWAGI

Oceniana rozprawa obejmuje 177 stron maszynopisu, w tym 31 rycin oraz 337 pozycji piśmiennictwa i zawiera typowe dla rozprawy doktorskiej rozdziały wzbogacone przez rozbudowane podrozdziały. Na 34 stronach WSTĘPU, poprzedzonego wykazem stosowanych w rozprawie skrótów oraz odczynników, Doktorantka przedstawiła najpierw aktualny stan wiedzy na temat syntezy, mechanizmów działania i biologicznej roli leptyny i jej receptora, greliny, oreksyn i ich receptorów, a także zależności jakie występują pomiędzy wzajemnymi poziomami peptydów układu oreksygenicznego i anoreksygenicznego w ustroju zwierząt, zwłaszcza we wczesnych etapach rozwoju i dojrzewania. Wyczerpująco opisała także związek pomiędzy fotoperiodem, a wydzielanymi w ustroju endogennymi wskaźnikami metabolizmu energetycznego. Poszczególne zagadnienia poruszane we WSTĘPIE zostały opisane szczegółowo, co wskazuje na dobrą znajomość przez Doktorantkę literatury dotyczącej tematyki pracy oraz umiejętność doboru i korzystania z właściwego piśmiennictwa. Moje uwagi do tej części rozprawy mają charakter edytorski i dotyczą jedynie pewnych nieścisłości. Hormony to substancje chemiczne koordynujące procesy życiowe zachodzące w różnych komórkach organizmów wielokomórkowych. Zarówno u zwierząt, jak i u roślin syntetyzowane zazwyczaj w jednych częściach organizmu,

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii
i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Endokrynologii

przemieszczają się do innych, gdzie wpływają na przebieg procesów wzrostu i rozwoju. Wyniki prowadzonych od dziesięcioleci badań fizjologicznych wskazują na plejotropowość działania hormonów, co w świadomości wielu fizjologów mogło wytworzyć przekonanie o ich niespecyficzności. W miarę poznawania molekularnych mechanizmów funkcjonowania hormonów staje się jasne, że działanie każdego z nich jest jednak specyficzne, czego podstawą są odrębne receptory i związane z nimi szlaki sygnałowe. Przyczyną obserwowanych efektów plejotropowych są liczne **interakcje**, do jakich dochodzi pomiędzy **szlakami przekazywania sygnałów poszczególnych** hormonów. Percepcja, a następnie transdukcja sygnału określonego hormonu prowadzi często do aktywacji, bądź represji charakterystycznego zestawu białek i/lub genów, wśród których znajdują się białka i geny związane z metabolizmem i szlakami sygnałowymi innych hormonów. Dlatego użycie sformułowania: „Interakcje pomiędzy tymi dwoma hormonami (tu: grelina i leptyna) są mechanizmem adaptacyjnym…" uważam za pewien skrót myślowy używany przez Autorkę. Doktorantka w swojej pracy bowiem nie bada szlaków przekazywania sygnału, a jedynie efekt czyli zmieniający się poziom uwalnianych peptydów. Ponadto, ta obszerna część rozprawy doktorskiej nie zawiera rycin/schematów i chociaż wprowadza w problematykę badanych zagadnień, to graficzne przedstawienie pewnych korelacji znacznie podniosłoby walory poznawcze pracy.

Ogólne cele pracy przedstawiono w postaci rozdziału ZAŁOŻENIA BADAWCZE I CEL PRACY. Doktorantka przyjęła dwa główne założenia badawcze, w oparciu o które podzieliła rozprawę na dwie części doświadczalne, przypisując im konkretne cele badawcze (w sumie wyznaczyła 8 szczegółowych zadań badawczych), które w kolejnym rozdziale UKŁAD DOŚWIADCZEŃ prezentuje. Rozumiem, że w zamierzeniu Doktorantki taka organizacja rozprawy doktorskiej miała uporządkować tak założenia prowadzonych prac badawczych jak, w konsekwencji, przedstawienie i przedyskutowanie otrzymanych wyników. Niestety, w mojej ocenie, efektem tak zaprezentowanych celów pracy są oddzielne rozdziały WPROWADZENIE, MATERIAŁY I METODY, WYNIKI i DYSKUSJA do każdego z założeń badawczych. Wprowadza to niepotrzebne zamieszanie zwłaszcza, że praca nie jest obszerna pod względem merytorycznym, nie jest także skomplikowana pod względem metodycznym. Co więcej, w podrozdziałach WPROWADZENIE pojawiają się niekonieczne powtórzenia nie wnoszące nic nowego do pracy.

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii
i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Endokrynologii

13 stron rozdziału MATERIAŁ I METODY (zaliczam tu rozdziały UKŁAD DOŚWIADCZEŃ, ZWIERZĄTA DOŚWIADCZALNE) do założenia I, a także 8 stron rozdziału MATERIAŁ I METODY (wraz z odrębnym WPROWADZENIEM) do założenia II zawierają opis metod badawczych, które wymieniłam już wcześniej. Opis każdej metody jest wzbogacony o wiadomości dotyczące stosownych kontroli. Obydwa rozdziały MATERIAŁY I METODY zostały przedstawione poprawnie. Dodatkowym atutem mogłoby być zamieszczenie szczegółowych rycin i fotografii przedstawiających schematy przebiegu tak podawania dokomorowego badanych czynników jak inkubacji fragmentów szyszynki z badanymi czynnikami. Szkoda, że Doktorantka umieściła fotografie niewielkich rozmiarów co sprawiło, że są one są nieczytelne. Natomiast przedstawienie na jednym schemacie wszystkich wariantów doświadczeń przeprowadzonych *in vivo* czy *in vitro* nie ułatwia zrozumienia założeń prowadzonych doświadczeń. Z powodzeniem można było wykonać kilka schematów odnoszących się do konkretnych grup doświadczalnych. Wybór dawek stosowanych czynników podawanych dokomorowo, czy też w inkubacjach Doktorantka uzasadnia danymi literaturowymi i pochodzącymi z badań własnych. Jednak nie podaje jak owe dawki się odnoszą się do poziomów fizjologicznych badanych związków, a w przypadku stosowanych antagonistów receptora leptyny, nie uzasadnia na jakiej podstawie wnioskuje, że podawana dawka skutecznie blokuje receptor. Ponadto, nie zalazłam również informacji jakie medium stanowiło kontrolę prowadzonych doświadczeń *in vitro* dla poszczególnych grup, a także, co stanowiło rozpuszczalnik dla podawanych czynników. W badaniach *in vitro*, znajomość stężenia rozpuszczalnika jest kluczowa, zwłaszcza w grupach doświadczalnych kiedy podaje się więcej niż jeden czynnik i może to skutkować podwojeniem stężenia rozpuszczalnika w medium. Zastrzeżenia moje budzi także ilość dodawanej do pożywki hodowlanej surowicy (FCS), stanowiącej aż 20% objętości całkowitej medium. Zdecydowanie szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o zastosowanie metody immunohistochemicznej, żeby pokazać w hodowanych eksplantach jak zmienia się np. immunoekspresja receptora leptyny, co zdecydowanie podniosłoby wartości poznawcze pracy i pozwoliło na bardziej precyzyjne formułowanie wniosków. Co więcej, wzbogaciłoby metodykę stosowaną w pracy. Chciałabym jednak podkreślić, że metody użyte w pracy są właściwie dobrane do założonych zadań badawczych, a tzw. „experimental design" rozprawy doktorskiej został poprawnie zaplanowany. I nawet jeżeli nie

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii
i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Endokrynologii

wszystkie możliwości, jakie daje dobrze zaplanowany eksperyment, zostały w pracy wykorzystane, to nie ma przeszkód by uczynić tak w trakcie przygotowywania wyników do publikacji. I na koniec tej części recenzji, prezentuję jeszcze kilka uwag dotyczących formy: WSTĘP, MATERIAŁY I METODY, a także WYNIKI i DYSKUSJA (dotyczy to obydwu części pracy) zawiera liczne zdania z problemami leksykalnymi, stylistycznymi, składniowymi i interpunkcyjnymi. Przykładem błędu leksykalnego jest np. wielokrotne użycie przez Doktorantkę zwrotów „aplikacja leptyny", „suplementacja pożywki", czy też „leptyna infundowana", „sezonowe fluktuacje" czy „iniekowany płyn", które zupełnie niepotrzebnie zniekształcają rozumienie tekstu, a z powodzeniem mogłyby być zastąpione zwrotami polskobrzmiącymi. Na stronie 42 w rozdziale MATERIAŁY I METODY wkradł się błąd edytorski: „Infuzje dokomorowe przeprowadzono w dwóch seriach obejmujących okres wydłużających się (marzec-maj) (SD; ang. *Short Days*) – powinno być (LD; ang. *Long Days*) - i skracających się dni (wrzesień-listopad) (LD; ang. *Long Days*) – powinno być (SD; ang. *Short Days*). Na kolejnej stronie rozprawy jest już umieszczona terminologia prawidłowa.

Rozdział WYNIKI (I i II) w sumie obejmuje 37 stron tekstu, 26 rycin/wykresów często złożonych z kilku wykresów. W ramach swojej rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyna Kirsz wykazała że leptyna podawana dokomorowo moduluje wydzielanie tak oreksyny B jak greliny, a także jest czynnikiem wpływającym na aktywność wydzielniczą szyszynki u owiec tak z dniu długim jak krótkim, karmionych zgodnie z normami. Ponad to, Doktorantka wykazała, że leptyna moduluje aktywność greliny i oreksyny A względem osi gonado- i somatotropowej. Stwierdziła, że wymienione hormony regulują wydzielanie melatoniny, GH i LH, co u zwierząt sezonowych dodatkowo podlega wpływom zmieniającego się fotoperiodu oraz statusu żywieniowego. Należy podkreślić, że cała dokumentacja WYNIKÓW rozprawy jest na bardzo dobrym poziomie technicznym i potwierdza staranne przeprowadzenie wszystkich eksperymentów i szczegółową analizę uzyskanych wyników.

Obejmujący w sumie 48 stron rozdział DYSKUSJA (I i II) zawiera interpretację uzyskanych wyników. W tej bardzo obszernej części rozprawy, Doktorantka podjęła próbę wyjaśnienia niektórych aspektów dotyczących mechanizmów regulacji gospodarki energetycznej u owiec pod wpływem stosowanych peptydów oraz antagonistów receptora leptyny. Otrzymane wyniki są trudne do interpretacji zwłaszcza, że doktorantka zastosowała tylko

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii
i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Endokrynologii

metody pozwalające ocenić efekt końcowy – zmieniający się poziom uwalnianych hormonów. DYSKUSJA wskazuje na ogromne oczytanie Doktorantki w zakresie przedmiotu swojej pracy. Szkoda, że jej nieuporządkowanie oraz ogrom powoduje, że staje się nieprzyjazna dla czytelnika. Nie pomaga też to, że poszczególne akapity zawierają dyskusję więcej niż jednego problemu, a część akapitów nie jest zakończona wnioskiem lub istniejący wniosek jest wysoce spekulacyjny, jeśli bierzemy pod uwagę metody zastosowane w podczas realizacji pracy doktorskiej. Dyskusja zakończona jest rozdziałami PODSUMOWANIE i WNIOSKI. Główne punkty podsumowania są zbieżne z celami pracy. Należy jednak być ostrożnym w wyciąganiu wniosków z niepotwierdzonych innymi metodami wyników doświadczeń. Oczywiście, jak słusznie zauważa Doktorantka, zweryfikowanie wyników wymaga dalszych badań.

Ostatnia część rozprawy to STRESZCZENIE w języku polskim i angielskim, które w mojej ocenie powinno znaleźć się na początku pracy, tradycyjnie tuż przed WSTĘPEM. BIBLIOGRAFIA stanowi bogaty spis literatury cytowanej w pracy , czyli 337 pozycji.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu "Oceny rozprawy" należy stwierdzić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki

wzbogacają naszą dotychczasową wiedzę w nowe informacje na temat równowagi energetycznej organizmów. Duża wartość rozprawy wynika z kompleksowego podejścia do rozpatrywanego problemu oraz zastosowania odpowiednio dobranych, nowoczesnych metod. Kompleksowe podejście polegało na zastosowaniu więcej niż jednego modelu doświadczalnego (badania *in vitro* i *in vivo*). Oceniana rozprawa nie tylko dostarcza danych, które wzbogacają już istniejącą wiedzę w nowe informacje, ale również, prezentowane tu wyniki stanowią podstawę do dalszych badań, zmierzających do pełniejszego poznania niezwykle złożonego procesu homeostazy energetycznej. W ocenianej pracy Doktorantka wykazała się dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada ważne w pracy badawczej cechy jak pracowitość i dociekliwość. Przedstawione zaś powyżej uwagi i pytania nie zmieniają wysokiej oceny pracy. Wskazują jedynie na niedociągnięcia

związane z procesem redagowania pracy oraz stanowią głos w dyskusji nad złożonymi procesami zachodzącymi w komórkach żywego organizmu.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny praca pt. "Oddziaływanie fotoperiodu na interakcje pomiędzy wybranymi hormonami zaangażowanymi w utrzymanie homeostazy energetycznej u owiec" spełnia wszystkie wymagania określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kirsz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.