

Łódź, 2021-06-09

Dr hab. n. med. profesor UM Adam Gesing
Zakład Endokrynologii Starzenia
Katedra Endokrynologii Onkologicznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Recenzja rozprawy doktorskiej
magistra Kamila Ziarniaka**

Tytuł rozprawy:

„Neurony KNDy a dysfunkcje układu rozrodczego szczuryc z indukowaną eksperymentalnie otyłością i cukrzycą typu 2”

Zaburzenia funkcji układu rozrodczego i związane z tym problemy dotyczące płodności należą do jednych z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny. Wiadomo, iż do istotnych przyczyn mogących prowadzić do zaburzeń cyklu miesięczkowego, zwiększonej częstości występowania poronień oraz bezpłodności należą m.in. choroby cywilizacyjne (charakteryzujące się zaburzeniami procesów metabolicznych), wśród których należy wymienić otyłość i cukrzycę typu 2. Kluczową rolę w fizjologicznej regulacji procesów rozrodczych pełni oś: podwzgórze-przysadka-gonady, w której nadrzędnym elementem regulacyjnym jest gonadoliberyna (GnRH) (produkowana w podwzgórzu). Wiadomo także, iż do utrzymania prawidłowej aktywności sekrecyjnej neuronów produkujących GnRH niezbędny jest tzw. system kisspeptynowy, w skład którego wchodzi kisspeptyna (produkowana głównie w jądrze łukowatym podwzgórza) oraz jej receptor – GPR54. Neurony kisspeptynowe wykazują także ko-ekspresję dwóch innych neuropeptydów – neurokininy B oraz dynorfiny A (neurony te zwane są neuronami KNDy). Prawidłowe interakcje pomiędzy procesami metabolicznymi i procesami rozrodczymi są uwarunkowane m.in. prawidłową funkcją neuronów KNDy; z kolei, zaburzenia metaboliczne mogą prowadzić do zaburzeń wydzielania GnRH i do nieprawidłowego stężenia gonadotropin i hormonów płciowych, wpływając na płodność i potencjał reprodukcyjny.

A zatem, badania podjęte przez Doktoranta dotyczące oceny wpływu indukowanej eksperymentalnie otyłości i cukrzycy typu 2 oraz zabiegu owariektomii (wraz z podawaniem

estradiolu/progesteronu) na funkcję i liczbę poszczególnych typów neuronów KNDy uważam za w pełni zasadne.

Przedłożony mi do recenzji tekst pracy doktorskiej - zawarty na 99 stronach - został przygotowany w starannej edycji komputerowej. Pozostała część rozprawy doktorskiej obejmuje pełne wersje 2 prac oryginalnych (w formacie pdf) (wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską) z pierwszym autorstwem Doktoranta: pierwsza z prac została opublikowana w *Journal of Neuroendocrinology* („High-fat diet and type 2 diabetes induced disruption of the oestrous cycle and alteration of hormonal profiles, but did not affect subpopulations of KNDy neurones in female rats”; Eksperyment 1), druga - w *Neuroscience* („Effects of ovariectomy and sex hormone replacement on numbers of kisspeptin-, neurokinin B- and dynorphin A-immunoreactive neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus in obese and diabetic rats”; Eksperyment 2). Ponadto, w tej części rozprawy zamieszczono oświadczenia poszczególnych współautorów, dotyczące ich procentowego udziału w obu ww. pracach.

Na początku rozprawy doktorskiej, Magister Kamil Ziarniak zawarł „**Spis treści**”, a następnie „**Wykaz stosowanych skrótów**”. W wykazie tym – zapewne przez pomyłkę edytorską – Doktorant nie zamieścił 2 skrótów wymienionych w dalszej części rozprawy, tj. FTO i MC4R (występujące na stronie 17). W kolejnej części rozprawy zamieszczono streszczenia (w języku polskim i angielskim).

We „**Wstępie**”, będącym **pierwszym (I) rozdziałem** pracy doktorskiej, Autor w interesujący sposób scharakteryzował m.in. doświadczalne modele zwierzęce mono- i wielogenowe otyłości i cukrzycy typu 2, opisał wpływ zaburzeń metabolicznych na funkcjonowanie osi regulacyjnej: podwzgórze-przysadka-gonady u ludzi i zwierząt, a także scharakteryzował lokalizację neuronów kisspeptynergicznych u ssaków oraz rolę kisspeptyny, neurokininy B i dynorfiny A w regulacji procesów fizjologicznych.

„**Hipotezy i cele badań**” stanowiące treść **rozdziału II** - obejmujące dwa przeprowadzone eksperymenty - nie budzą zastrzeżeń.

W **rozdziale III** zatytułowanym „**Materiały i metody badawcze**”, Doktorant w jasny i przejrzysty sposób opisał m.in. podział zwierząt na poszczególne grupy doświadczalne, ocenę faz cyklu rujowego, sposób pobrania tkanek przeznaczonych do dalszych analiz, metodykę badań immunohistochemicznych oraz zastosowane metody analizy statystycznej.

- W podrozdziale dotyczącym opisu badań immunohistochemicznych, zmieniłbym liczbę pojedynczą na liczbę mnogą w stwierdzeniach odnoszących się do inkubacji

tkanek z odpowiednimi przeciwciałami („skrawki inkubowano z zastosowaniem króliczych przeciwciał” zamiast „skrawki inkubowano w króliczym przeciwciele”).

- Ponadto, w **Eksperymencie 2** – w którym przeprowadzono zabieg owariektomii – właściwą grupą kontrolną powinna być grupa, w której zwierzęta zostały poddane zabiegom operacji pozornych (‘sham operation’) (w związku z tym - bardzo proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do tej kwestii).

„**Wyniki**”, które stanowią **rozdział IV** rozprawy, przedstawione zostały w klarowny sposób w kilku rozdziałach i podrozdziałach, odnoszących się odpowiednio do obu wspomnianych wcześniej eksperymentów badawczych. Chciałbym jednak zwrócić uwagę na następujący element pracy odnoszący się do tego rozdziału, który – moim zdaniem – powinien zostać przedyskutowany:

- Na stronie **62** w podrozdziale **2.2**, Autor pisze m.in.:” W toku analizy wykazano również, że na stężenie E2 w surowicy wpłynęły wywołane u zwierząt stany metaboliczne... - stężenie E2 było istotnie wyższe u szczurzy z grup HFD... i DM2 w porównaniu do grupy K (Fig. 4A). Czy Autor może wyjaśnić jaka jest tego przyczyna? W jaki sposób ww. zaburzenia metaboliczne mogą prowadzić do podwyższonego stężenia E2? Co prawda, w rozdziale **V („Dyskusja”)** Doktorant przedstawia możliwe wytłumaczenie tego efektu, wskazując na potencjalną rolę aromatazy, to jednak prosiłbym Autora o możliwie jak najdokładniejsze omówienie ww. zależności.

Uzyskane przez Mgr Kamila Ziarniaka wyniki badań zostały w interesujący i dojrzały sposób przedyskutowane w **rozdziale V („Dyskusja”)** z wykorzystaniem bogatego piśmiennictwa.

Kolejny rozdział - **rozdział VI** zatytułowany: „**Podsumowanie dyskusji. Proponowane kierunki dalszych działań**” nie budzi zastrzeżeń.

Rozdział VII („Wnioski”) zawiera 5 wniosków ogólnych, które w przejrzysty sposób podsumowują uzyskane przez Doktoranta wyniki badań. Jedynie we wniosku nr 4 – nie porównywałbym wyników u samic (uzyskanych przez Autora w ramach rozprawy doktorskiej) w stosunku do samców (praca doktorska nie obejmuje przecież swoją tematyką osobników płci męskiej); natomiast oczywiście porównanie takie może być zawarte w dyskusji.

„Literatura” zawiera 254 pozycje piśmiennicze – niemal wyłącznie - anglojęzyczne. Dobór piśmiennictwa jest poprawny i świadczy o szerokiej znajomości przez Doktoranta literatury z zagadnień stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, pragnę podkreślić, iż bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską Magistra Kamila Ziarniaka m.in. ze względu na wielość zastosowanych metod badawczych, dużą oryginalność uzyskanych wyników badań oraz ich nowatorstwo [wg dostępnej mi wiedzy - są to pierwsze badania, w trakcie których zbadano – w ramach jednego eksperymentu - wpływ 2 jednostek chorobowych (charakteryzujących się zaburzonym stanem metabolicznym), tj. otyłości wywołanej podawaniem diety wysokotłuszczowej i cukrzycy typu 2 (wyindukowanej podawaniem streptozotocyny) na liczbę neuronów KNDy w jądrze łukowatym u osobników płci żeńskiej, z jednoczesnym odniesieniem do efektu działania hormonów płciowych]. Badania te zostały prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone, a uzyskane wyniki przedyskutowane w dojrzały sposób.

W związku z powyższym, zwracam się z uprzejmym wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Magistra Kamila Ziarniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, uwzględniając – wspomnianą przeze mnie – dużą oryginalność i nowatorstwo uzyskanych przez Doktoranta wyników badań, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z wnioskiem o wyróżnienie pracy.

Adam Gęsiński