



INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn 5; skr. poczt.55
www.pan.olsztyn.pl

ODDZIAŁ BIOLOGII ROZRODU

tel. 89 535 74 22; fax 89 535 74 21; e-mail: vet@pan.olsztyn.pl

dr hab. Agnieszka Blitek
Zakład Mechanizmów Działania Hormonów
IRZBŻ PAN w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Elżbiety Marciniak
pt.: „*Salsolinol jako modulator aktywności sekrecyjnej układu GnRH/LH
u owcy w okresie laktacji*”

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. Tomasza Misztala. Podstawą rozprawy są dwie spójne tematycznie publikacje naukowe, które ukazały się w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach z listy *Journal Citation Reports: Theriogenology* (IF_{5-letni} = 2,127) oraz *Domestic Animal Endocrinology* (IF_{5-letni} = 1,875). Czasopisma te znajdują się również w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z przyznanymi 30 punktami każde z nich. W obu pracach Pani mgr Elżbieta Marciniak jest pierwszym autorem, a Jej wkład w powstanie tych prac, jak wynika z oświadczeń współautorów, jest znaczący (co najmniej 65%) i obejmuje m.in. udział w opracowaniu koncepcji badań i wykonywaniu doświadczeń, prowadzenie analiz laboratoryjnych, opracowanie i interpretację wyników oraz współudział w przygotowaniu manuskryptów do druku. Przedstawione prace zostały opatrzone 42-stronicowym opracowaniem, na które składają się: streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, hipoteza badawcza i cele pracy, opisy doświadczeń i uzyskanych wyników, dyskusja, wnioski oraz bibliografia. Badania do pracy doktorskiej wykonano w oparciu o środki finansowe pochodzące z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekt nr N N311 082037.

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy wpływu salsolinolu, endogennej pochodnej dopaminy, na sekrecję GnRH i LH u owiec podczas laktacji i powiązana jest ściśle z badaniami prowadzonymi przez Zespół promotora ocenianej dysertacji, Pana prof. dr. hab. Tomasza Misztala, nad mechanizmami neuroendokrynnej regulacji rozrodu zwierząt. Przedmiot zainteresowania Autorki, salsolinol, był i jest intensywnie badany przez światowe ośrodki naukowe m.in. w kontekście swojej znaczącej roli w etiopatogenezie choroby Parkinsona. Od kilku lat prowadzone są również badania nad fizjologiczną rolą tego związku w ośrodkowym układzie nerwowym, a prace Zespołu prof. Misztala przyczyniły się w znaczącym stopniu do poznania i zrozumienia roli salsolinolu u owiec. Związek ten jest obecny w podwzgórzcu owiec w okresie laktacji, a jego koncentracja w przestrzeniach międzykomórkowych lejka/wyniosłości pośrodkowej wzrasta znacząco w odpowiedzi na impuls ssania równoległe ze wzrostem prolaktyny we krwi obwodowej. Dotychczas wykazano stymulujący wpływ salsolinolu na syntezę i sekrecję prolaktyny oraz istnienie zależności pomiędzy salsolinolem a endogennymi peptydami opioidowymi. Wysoka zawartość salsolinolu produkowanego przez podwzgórzowy układ dopaminergiczny podczas laktacji oraz zaangażowanie układu dopaminergicznego w regulację sekrecji GnRH/LH skłoniły Autorkę ocenianej dysertacji do postawienia hipotezy, że salsolinol może modulować aktywność sekrecyjną podwzgórzowo-przysadkowego układu GnRH/LH u owcy podczas laktacji. Stąd, wybór tematu jest logiczną konsekwencją wcześniejszych obserwacji, zmierzającą do uzyskania pełnego obrazu zmian adaptacyjnych u samic w okresie laktacji.

OCENA MERYTORYCZNA PRACY

Oceniana rozprawa ma charakter opracowania, której zasadniczą część stanowią oryginalne prace twórcze, uprzednio poddane ocenie redakcyjnej i wnikliwym recenzjom. O wysokiej wartości poznawczej wyników pracy doktorskiej świadczy fakt ich opublikowania w wiodących czasopismach międzynarodowych o tematyce obejmującej endokrynologię rozrodu zwierząt gospodarskich. Obie prace są spójne tematycznie i metodycznie, a jako całość dostarczają istotnej wiedzy z zakresu neuroendokrynnych regulacji funkcji rozrodczych w okresie poporodowym. W trakcie lektury obu prac nie znalazłam elementów problematycznych czy wzbudzających moje wątpliwości. Prace są napisane zrozumiale, z jasno postawionymi celami, podanymi szczegółami metodycznymi i prawidłowo poprowadzoną dyskusją. Dokumentacja graficzna wyników w postaci wykresów jest jasna i czytelna. Chciałabym jedynie zwrócić uwagę na fakt, iż w dyskusji wyników uzyskanych w ramach eksperymentu *in vitro* (publikacja 2: Marciniak i wsp., *Domestic Animal Endocrinology*, 2017) Autorka użyła określenia „...LH concentrations in all groups decreased over time”, natomiast zabrakło mi zarówno w opisie wyników (str. 100 publikacji), jak i na wykresie

(str. 101 publikacji) istotności statystycznych, które oddawałyby ten opisywany, zależny od czasu inkubacji, spadek zawartości LH w medium.

Nieco szerzej skupię się na ocenie polskojęzycznego opracowania poprzedzającego opublikowane prace twórcze. Taka skrócona, w porównaniu do monografii, forma rozprawy powoduje, że jej Autor musi wykazać się umiejętnością zwięzłego i precyzyjnego opisu wykonanych badań. W mojej opinii Pani mgr Elżbieta Marciniak dokonała przejrzystego połączenia obu prac składających się na rozprawę doktorską. Tę część czyta się z przyjemnością, mając pewność, że cała praca jest przemyślanym, konsekwentnie realizowanym pomysłem badawczym, o dużej wartości poznawczej. Poniżej uzasadnię swoją opinię odnosząc się do poszczególnych rozdziałów.

Wstęp oraz Hipoteza badawcza i cele pracy

We *Wstępie* Autorka dokonała zwięzłej charakterystyki osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej u samic, bardzo wnikliwie opisując zmiany aktywności sekrecyjnej GnRH/LH podczas laktacji z uwzględnieniem znanych i potencjalnych regulatorów funkcjonowania tego układu. Następnie, w sposób przejrzysty przedstawiła dostępną w literaturze wiedzę o roli salsolinolu w ośrodkowym układzie nerwowym, przytaczając wyniki badań uzyskanych u różnych gatunków zwierząt. Rozdział ten napisany jest bardzo logicznie, prowadzi Czytelnika od ogólnych wiadomości do coraz głębszych szczegółów, by zakończyć sformułowaniem celu pracy. Dowodzi również szerokiej wiedzy Autorki w omawianej tematyce i jej bardzo dobrego merytorycznego przygotowania do prowadzenia badań. Hipoteza badawcza i cele pracy zostały prawidłowo sformułowane. Jednocześnie uważam, że postawiona hipoteza jest zbyt ostrożna. W mojej opinii, mając tak ogromną wiedzę i znając dotychczasowe wyniki badań na temat roli salsolinolu podczas laktacji u owiec, można było pokusić się o sprecyzowanie czy wpływ tego związku na uwalnianie GnRH/LH będzie stymulujący czy hamujący. Jest to oczywiście kwestia do dyskusji i chciałabym prosić Autorkę o komentarz w tej sprawie – jakiego efektu modulującego salsolinolu się spodziewała?

Opis doświadczeń

Autorka w skróconej formie podaje opis doświadczeń, odsyłając czytelnika po szczegóły do obu publikacji. Lektura tego rozdziału nie pozostawia wątpliwości, że układ doświadczeń, dobór metod badawczych i analitycznych został dokonany prawidłowo i gwarantuje uzyskanie wartościowych i wiarygodnych wyników. Trzeba w tym miejscu docenić trudność części eksperymentalnej pracy, która wymagała niezwyklej uwagi i doświadczenia operacyjnego. Jestem przekonana, że przeprowadzenie tak precyzyjnie zaplanowanych i wykonanych doświadczeń nie

byłoby możliwe bez zaangażowania i pomocy ze strony Opiekuna naukowego Pana prof. dr hab. Tomasza Misztala.

Nowatorskie zastosowanie infuzji 1-MeDIQ do jądra lejka/wyniosłości pośredkowej z jednoczesnym pobieraniem płynu mózgowo-rdzeniowego zasługuje na szczególne uznanie. Dużym walorem części metodycznej pracy jest także określenie wpływu salsolinolu na syntezę i sekrecję LH w układzie *in vivo* (infuzje do trzeciej komory mózgu) oraz *in vitro* (inkubacje skrawków przysadki w obecności salsolinolu).

Z obowiązków recenzenta muszę stwierdzić, że zabrakło mi w tym rozdziale kompleksowego schematu doświadczeń, który dałby ogólne spojrzenie jaki związek, kiedy, jak długo i gdzie był podawany oraz jaki materiał biologiczny i po jakim czasie pozyskiwano. Zauważyłam też niezgodność liczby zwierząt użytych w Doświadczeniu 2: zgodnie z opisem zamieszczonym w *Theriogenology* wykorzystano 16 owiec (str. 1932 publikacji), natomiast w polskojęzycznym opracowaniu Autorka podaje liczbę 8 zwierząt (str. 16).

Opis wyników doświadczeń

Ta część zawiera zwięzły opis wyników badań zawartych w dwóch pracach stanowiących rozprawę doktorską. Autorka dokonała tego dzieląc rozdział na podrozdziały, z których każdy odpowiadał jednemu z czterech przeprowadzonych doświadczeń. Opis jest zrozumiały, nawet bez graficznej prezentacji wyników (ta jest dostępna w opublikowanych pracach). Mam tylko uwagę do opisu wyników dotyczących ekspresji LH β mRNA. Na str. 18 Autorka podaje „*Względny poziom ekspresji mRNA dla podjednostki LH β u owiec otrzymujących infuzje salsolinolu był wyższy niż u owiec, którym wykonano infuzje kontrolne, jednak różnice nie były istotne statystycznie*”. W mojej opinii określenia „wyższy” i „nie były istotne” wzajemnie się wykluczają z punktu widzenia statystyki. Czy nie lepiej byłoby podać dokładną wartość P, która jak wynika z publikacji 1 (Marciniak i wsp., *Theriogenology*, 2016) wynosiła mniej niż 0,08 i użyć sformułowania: „obserwowano tendencję do zwiększonej ekspresji podjednostki LH β w owiec otrzymujących infuzje salsolinolu”? Oczywiście, nie można na tej podstawie wyciągać wiarygodnych wniosków, ale takie pokazanie wyników wskazywałoby na pewne zależności, które w innych warunkach, np. przy większej liczebności grup, mogłyby być istotne statystycznie.

Dyskusja i Wnioski

Chciałabym wyrazić swoje ogromne uznanie dla Autorki pracy za niezwykle wnikliwą i wzorowo poprowadzoną dyskusję uzyskanych wyników. Jest to widoczne zarówno w polskojęzycznym opracowaniu, jak i opublikowanych pracach i świadczy o dużej wiedzy Autorki i umiejętności posługiwania się danymi literaturowymi. Dyskusja wyników była zapewne dużym

wyzwaniem, ponieważ uzyskano niezwykle ciekawe, lecz sprzeczne ze sobą wyniki. I tak infuzja 1-MeDIQ do trzeciej komory mózgu obniżała, a do jądra lejka/wyniosłości pośredkowej zwiększała, koncentrację LH we krwi obwodowej owiec w laktacji. Przeciwny efekt na sekrecję LH obserwowano także podając salsolinol *in vivo* (infuzje) i *in vitro* (dodatek do medium inkubacyjnego). Tłumacząc wyniki badań Autorka wskazuje na różne drogi działania salsolinolu oraz interakcje między hormonami, neuroprzekaznikami i innymi biologicznie czynnymi substancjami produkowanymi lokalnie. Świadczy to o ogromnej złożoności regulacji na różnych poziomach wewnątrz organizmu. Jestem przekonana, że w trakcie dyskusji wyników zrodziły się również pomysły dalszych badań zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów działania salsolinolu w ośrodkowym układzie nerwowym.

Moja uwaga do rozdziału *Dyskusja* jest raczej prośbą o ustosunkowanie się do dwóch kwestii:

1. Na str. 26 opracowania Autorka napisała w odniesieniu do braku zmian koncentracji GnRH przy jednoczesnym wzroście koncentracji i częstotliwości pulsów LH: „...*brak różnic mógł wynikać w wyraźnych wahań stężenia GnRH w próbkach, zarówno u poszczególnych osobników, jak i w porównaniu obydwu grup. ...na brak różnic miała (wpływ) niewątpliwie długa 30-minutowa kolekcja jednej próbki CSF... Tego rodzaju schemat kolekcji CSF nie pozwolił na precyzyjne określenie parametrów pulsacyjnego uwalniania GnRH...*”. Chciałabym zapytać czy teraz, mając już pewne doświadczenie, ma Autorka pomysł jak ulepszyć tę bardzo wartościową, jak sama podkreśla, metodę pobierania prób płynu mózgowo-rdzeniowego po infuzji badanego czynnika do jądra lejka/wyniosłości pośredkowej?
2. Jak wytłumaczyć podwyższenie koncentracji LH we krwi bez zmian ekspresji LH β mRNA (Doświadczenie 2)? Czy jest to tylko zwiększona sekrecja, bez zmian w syntezie hormonu? Co ciekawsze - jaki może być ogólny mechanizm stojący za obniżoną koncentracją LH w medium inkubacyjnym bez zmian w ekspresji mRNA (Doświadczenie 4)?

Polskojęzyczne opracowanie zawiera 3 wnioski, które w jednoznaczny sposób wskazują na zrealizowanie celów pracy i stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę na temat aktywności sekrecyjnej podwzgórzowo-przysadkowego układu GnRH/LH u owcy.

Do szczególnych osiągnięć ocenianej pracy zaliczam: (1) uzyskanie wartościowych, pionierskich wyników wnoszących istotny wkład naukę, czego dowodem jest opublikowanie prac stanowiących rozprawę w bardzo dobrych, światowych czasopismach naukowych z listy JCR; (2) wykazanie, że salsolinol jest istotnym elementem neuroendokrynych regulacji w ośrodkowym układzie nerwowym jako modulator sekrecji GnRH/LH, które są kluczowymi hormonami

regulującymi rozród zwierząt; (3) zdolność do syntetycznego i zrozumiałego opisu uzyskanych wyników i umiejętność prowadzenia dyskusji naukowej.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Elżbiety Marciniak jest wartościowym dziełem naukowym, zawierającym pionierskie wyniki poszerzające wiedzę z zakresu fizjologii zwierząt. Dowodzi też umiejętności planowania i prowadzenia badań oraz wnioskowania w oparciu o uzyskane wyniki. Przeprowadzone badania na żywych zwierzętach wymagały znakomitego przygotowania merytorycznego i warsztatowego. Zawarte w niniejszej recenzji uwagi i komentarze są zachętą do naukowej dyskusji i nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej pracy doktorskiej.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. „*Salsolinol jako modulator aktywności sekrecyjnej układu GnRH/LH u owcy w okresie laktacji*” i indywidualny wkład Autorki w powstanie tej pracy spełniają wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „*O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*” (dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. J. Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie o dopuszczenie mgr Elżbiety Marciniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na znaczne walory poznawcze pracy, potwierdzone opublikowaniem wyników badań w uznanych czasopismach naukowych wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Olsztyn, 03.10.2017 r.