

Prof. dr hab. Paweł Maćkowiak
Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Ul. Wołyńska 35
60-637 Poznań

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr MICHAŁA SZLISA
zatytułowanej:**

**NEUROMODULACYJNE ODDZIAŁYWANIE OBESTATYNY NA AKTYWNOŚĆ OSI
SOMATOTROPOWEJ I GONADOTROPOWEJ U OWIEC
(THE NEUROMODULATORY ACTION OF OBESTATIN ON THE SOMATOTROPHIC AND
GONADOTROPHIC AXES ACTIVITY IN SHEEP)**

Oceny rozprawy doktorskiej dokonano na podstawie decyzji Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN na posiedzeniu w dniu 23 lutego 2016 r.

Minęło ponad 20 lat od odkrycia leptyny, hormonu sterującego z obwodu ciała pobieraniem pokarmu. Odkrycia kolejnych hormonów wydzielanych z tkanki tłuszczowej i żołądka spowodowały lawinę nowych prac zmierzających do rozszyfrowania ich roli w sterowaniu ośrodkami głodu i sytości. Równoległe obok tego nurtu zaczęto dostrzegać inne, acz niebagatelne przejawy działania – regulacyjny wpływ na proces rozrodu oraz wzrostu organizmu. W te właśnie aspekty wpisuje się tematyka recenzowanej pracy.

1. Charakterystyka dysertacji doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa ma charakter doświadczalny; poza spisem treści liczy 88 stron i zawiera wszelkie formalnie niezbędne elementy, takie jak: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów, Wstęp, Hipotezę i zadania badawcze, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Posumowanie, Wnioski, Bibliografię, Spis tabel, Spis rycin. W dysertacji zamieszczono 5 tabel i 30 rycin.

Wstęp jest dobrze i w sposób skondensowany napisaną częścią pracy, wprowadzającą w mechanizmy neurohormonalnego oddziaływania podwzgórza oraz w drogę powstawania obestatyny i jej rolę w regulacji pobierania pokarmu oraz osi wzrostowej i gonadotropowej. W dalszej części dysertacji Autor przedstawia hipotezę badawczą i logiczny sposób jej weryfikacji poprzez realizację poszczególnych zadań. Rozdział Materiały i metody liczy ponad

16 stron i został przedstawiony bardzo szczegółowo, wskazując na znajomość licznych technik badawczych. Rozdział Wyniki liczy 26 stron, a oprócz opisu słownego rezultaty zostały udokumentowane w postaci 28 rycin zawierających wykresy i zdjęcia preparatów. Oddzielną część pracy stanowi Dyskusja, w której mgr Michał Szlis komentuje uzyskane przez siebie wyniki na tle dostępnej wiedzy. Kolejnymi krótkimi częściami pracy są prawidłowo zredagowane Podsumowanie oraz Wnioski

2. Uwagi krytyczne i usterki zauważone w pracy

Dostrzeganie obok atutów także usterek czy mankamentów jest jednym z obligatoryjnych zadań recenzenta. W przedstawionej pracy uchybień jest bardzo niewiele. Nie mają one istotnego znaczenia mogącego obniżyć w jakikolwiek sposób dużą wartość merytoryczną pracy. Część uwag ma charakter dyskusyjny, część to zapytania kierowane do Autora pracy i wreszcie niektóre to drobne usterki stylistyczne i redakcyjne.

1/. Ostrożnie używałbym terminu „prawidłowe” (str. 2 w. 4 od dołu; str. 19 w. 4; str. 75 w. 3 od dołu). Użycie tego słowa w kontekście „...obstatyna może modulować prawidłowe funkcjonowanie...” mogłoby wskazywać, że w pewnym sensie działa niekorzystnie, podczas kiedy zapewne jest po prostu włączona w naturalnych warunkach fizjologicznych razem z innymi czynnikami, jak to podkreśla sam Autor, w regulację funkcjonowania hormonalnej osi wzrostowej i rozrodczej. Oczywiście punkt widzenia Autora pracy może być odmienny niż mój, stąd też chętnie usłyszę komentarz.

2/. Autor pisze, że infuzje wykonywano w godzinach 8.30-14.00 (str. 21), a krew pobierano w 10-minutowych odstępach w godzinach 8.00 do 14.00. Czy w związku z powyższym na wykresach (str. 49 i 61 – „Wzór uwalniania GH” i „Wzór uwalniania LH”) pierwsze kilka „punktów czasowych” odpowiada sytuacji jeszcze sprzed rozpoczęcia iniekcji?

3/. Kłopotliwe jest zapewne oddanie w języku polskim pełnej nazwy skrótu AgRP, jednak określenie „peptyd pochodzący od białka Agouti” (str.5 i 11) wydaje się mało zręczne. Czy nie lepiej pozostać przy określeniu peptyd AgRP lub białko AgRP bez tłumaczenia nazwy, bądź użyć nazwy angielskiej?

4/. Czy naprawdę aż 12 dób inkubowano skrawki z przeciwciałami pierwszorzędowymi, (jeśli tak to z czego to wynikało) czy jest to błąd redakcyjny? (str. 28)

5/. Niejasny jest opis procedury przygotowania prób do oznaczeń na str. 33 – czy uzyskane uprzednio supernatanty były jeszcze raz wirowane?

6/. Inne drobne dostrzeżone usterki:

Na stronie 17. w. 17-18 zapewne chodzi nie o sekrecję ale odpowiednio o: syntezę (cAMP), aktywację ERK1/2 i aktywację kinazy?

Str. 3 w. 4 – niepotrzebne są dwa przecinki; str. 13 w. 5 powinno być Lin i wsp. 2011; str. 34 – powinno być „międzyseryjnego”, a jak wynika z tekstu prawdopodobnie sam komputer obsesyjnie wprowadzał na tej stronie słowo „międzysesyjne”; str. 35 powinno - być Merriam i wsp. 1982; str. 40 – w. 11 od dołu – powinno być „transkryptu”; str. 71 – zapewne powinno być „Sarkar 1987”; str. 72 w. 18 powinno być Fernandez-Fernandez i wsp. 2006

3. Merytoryczne aspekty i atuty pracy

Wielkim walorem pracy jest dojrzałe i kompleksowe podejście do rozwiązania podjętego tematu badawczego. Wyraża się ono się zastosowaniem technik pozwalających na ocenę ekspresji genów w podwzgórzu i przysadce na poziomie mRNA i białka oraz określenie zawartości hormonów w przysadce oraz we krwi. Szkoda jednocześnie, że Autor, zamieszczając względną ilość hormonów w przysadce, nie podał równoległe ilości bezwzględnej (w przeliczeniu na białko bądź masę przysadki). Informacje te mogłyby być bardzo użyteczne dla endokrynologów. Warsztat badawczy, którym posługuje się Autor, jest bardzo rozbudowany, poczynając od izolacji RNA, przepisywania na cDNA i analizy ekspresji techniką PCR w czasie rzeczywistym, po procedury immunohistochemiczne z analizą obrazu oraz techniki radioimmunologiczne. Taka mnogość zastosowanych metodyk oraz podjęta w dysertacji złożona problematyka świadczą o szerokiej wiedzy Autora tak w zakresie biologii molekularnej, immunohistochemii, jak i endokrynologii. Pan magister Michał Szlis w pełni wykorzystał potencjał naukowy Instytutu, wzorce naukowe i dotychczasową myśl przewodnią realizowaną przez lata w Zakładzie Endokrynologii. Dzięki temu, jak się można zorientować z pracy, były możliwe m. in. analizy radioimmunologiczne hormonów osi wzrostowej i gonadotropowej owiec - z zastosowaniem techniki znakowania w obrębie Instytutu i dzięki posiadaniu unikatowych, podarowanych lub wytworzonych w Instytucie przeciwciał. Możliwe było też przeprowadzenie analiz immunohistochemicznych opartych o wypracowane metodyki. Uzyskane podczas realizacji pracy wyniki świadczą o tym, że

potwierdziła się założona hipoteza badawcza o modulowaniu przez obestatyne ekspresji genów w strukturach podwzgórza i przysadce mózgowej oraz wpływie na oś gonadotropową i somatotropową. Jako rezultat badań Autor między innymi po raz pierwszy bardzo kompleksowo i szczegółowo przedstawia rolę obestatyne w regulacji ekspresji NPY, regulacji osi somatotropowej i osi gonadotropowej na różnych poziomach. Autor wyciąga w pracy prawidłowe wnioski w oparciu o uzyskane rezultaty badań, a jednocześnie dyskutuje je szeroko w świetle literatury naukowej zamieszczanej w renomowanych czasopismach, odnosząc się do badań prowadzonych w ośrodkach zagranicznych oraz i w Instytucie. Bardzo istotne jest to, że Autor dostrzega w dyskusji niebagatelny wkład naukowy pracowników Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt w tematykę neuroendokrynną związaną z regulacją pobierania pokarmu, osi wzrostowej i gonadotropowej.

Wyniki uzyskane w pracy mają wielki walor poznawczy i wnoszą do endokrynologii nowe istotne treści. Jednocześnie, co przebija z dysertacji, to ogromna ilość analiz, poświęconego czasu i włożonej pracy w realizację badań. Autor określił ekspresję 11. genów za pomocą techniki RT-qPCR w strukturach podwzgórza i przysadce. Przeprowadził również badania immunohistochemiczne dla 6. czynników peptydowych oraz badania radioimmunologiczne zawartości hormonów w przysadce i w osoczu. Jako atut pracy można również wymienić kompleksowe postrzeganie całej sieci powiązań neuroendokrynnych, nie zaś traktowanie badanej przez siebie tematyki jedynie w sposób wybiórczy. Ponadto, całość pracy została napisana dobrze pod kątem naukowym, gramatycznym i stylistycznym. Zamieszczone ryciny są właściwie wykonane, czytelne i pomocne w jej analizie. Wszystkie te rzeczy świadczą o osiągnięciu przez Pana magistra Michała Szlisa dojrzałości naukowej, a bardzo duża wartość poznawcza pracy z pewnością umożliwi opublikowanie wyników w renomowanych czasopismach z obiegu międzynarodowego.

4. Wnioski końcowe

Rozprawa doktorska Pana mgr. Michała Szlisa stanowi istotną pozycję naukową w obszarze fizjologii/endokrynologii z ukierunkowaniem na regulacje osi hormonalnych. Podjęta tematyka jest aktualna i nowatorska, a uzyskane rezultaty wzbogacają w sposób znaczący dotychczasową wiedzę.

Recenzowana praca doktorska Pana mgr. Michała Szlisa spełnia bez żadnych zastrzeżeń wymogi stawiane dysertacjom doktorskim (określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595) wraz z późniejszymi zmianami).

Stąd też, z uczuciem satysfakcji i pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr. Michała Szlisa do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoką wartość merytoryczną pracy i istotną myśl naukową w niej zawartą oraz bogactwo warsztatu naukowego, wnioskuję o uhonorowanie Pana mgr. Michała Szlisa odpowiednią nagrodą.

Poznań, 11. maja 2016 r.

Prof. dr hab. Paweł Maćkowiak

