Prof. dr hab. Krystyna Skwarło-Sońta
Zakład Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr MAGDALENY OLGI CIECHANOWSKIEJ,

zatytułowanej:

EKSPRESJA GENÓW GnRH i RECEPTORA GnRH W UKŁADZIE PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWYM OWCY W RÓŻNYCH STANACH FIZJOLOGICZNYCH; WPŁYW CZYNNIKÓW STRESOGENNYCH

Badania roli fizjologicznej i mechanizmów działania neurohormonów podwzgórzowych postępują nieustannie od momentu ich odkrycia w latach 70. ubiegłego wieku, a intensywne poszukiwania ich analogów dających się zastosować w praktyce medycznej są jednymi z ważniejszych czynników nadających tym badaniom odpowiedniego tempa, stając się jednocześnie motorem postępu w tej dziedzinie. Wśród nich, analogi gonadoliberyny GnRH są bardzo szeroko stosowane jako środki terapeutyczne w wielu schorzeniach, nie koniecznie związanych z rozrodem. Działanie tego neurohormonu obejmuje bowiem nie tylko centralny i obwodowy układ nerwowy, ale także tkanki związane i nie związane z rozrodem np. układ odpornościowy.

Rozrodczość ssaków jest regulowana przede wszystkim przez wpływ GnRH na gonadotropy w przysadce, w których moduluje ekspresję genów i sekrecję gonadotropin, które z kolei wpływają na gonady, stymulując w nich gameto- i steroidogenezę. Dysfunkcja na poziomie ekspresji genów w obrębie całej osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej (HPG) może prowadzić do licznych zaburzeń funkcji układu rozrodczego, a w skrajnych przypadkach do niepłodności. O ile jednak pierwotna funkcja GnRH, związana z regulacją gonadotropów jest już poznana dość dobrze, to szersze niż związane z osią HPG występowanie tego neurohormonu i jego receptora, wprawdzie nie budzi wątpliwości ale ciągle pozostaje w sferze poszukiwań. Zatem poznanie mechanizmów molekularnych regulujących ekspresję genów kodujących składowe osi HPG wydaje się niezbędne do zrozumienia fizjologii i patologii rozmnażania, a badania podjęte przez mgr Magdalenę Ciechanowską wpisują się w najnowszy nurt poszukiwań w tej dziedzinie.

I. Uwagi ogólne

Przedstawiona mi do oceny dysertacja to typowy doktorat z zakresu nauk eksperymentalnych, zawiera bowiem wszystkie części, z jakich zazwyczaj składają się takie rozprawy. Liczy 142 stronice tekstu, a poszczególne rozdziały proporcjonalnie tworzą całość napisaną starannie, zarówno pod względem językowym jak i edytorskim. Tekst jest zwięzły, ilustrowany właściwie skomponowanymi schematami (Wstęp oraz Materiał i Metody) oraz wykresami i diagramami, dokumentującymi uzyskane wyniki.

W stosunkowo krótkim, bo liczącym tylko 15 stronic, ale bardzo esencjonalnym Wstępie został przedstawiony neurohormon GnRH, jego cząsteczka i receptor, oraz ich lokalizacja w Ośrodkowym Układzie Nerwowym (OUN), w powiązaniu z modyfikacjami

funkcji osi HPG przez szlaki neuronalne oraz różne stany fizjologiczne, w tym sezon, cykl estralny, stres. A wszystko po to, aby jasno i klarownie wyłożyć założenia i cel pracy (2 str.).

Część materiałowo-metodyczna jest również krótka (13 stronic), ale zawiera wszystkie niezbędne informacje o zwierzętach, układzie doświadczalnym, wykonanych analizach i sposobie obróbki uzyskanych wyników. Zastosowana analiza statystyczna pozwoliła na porównanie istotności różnic opisywanych zjawisk w poszczególnych sytuacjach eksperymentalnych.

Najdłuższy, bo 40-stronicowy rozdział przedstawiający i opisujący Wyniki jest podzielony na podrozdziały, co ułatwia śledzenie kolejno powstających rezultatów, każdy z nich ma też oddzielną numerację rycin. Zdaniem recenzenta jest ich w sumie 16 (i jedna tabela) a także znaczna liczba NIENUMEROWANYCH wykresów, obrazujących przykładowe profile poziomów LH w surowicy badanych owiec w różnych wariantach eksperymentu. Trudno mi dociec, dlaczego te wykresy (doliczyłam się ich aż 10 oraz jednego zdjęcia obrazu elektroforetycznego) nie zasłużyły na to aby je policzyć i opisać – a przecież to na ich podstawie powstały histogramy, dokumentujące zmiany poziomu tej gonadotropiny oraz amplitudę i częstotliwość pulsów hormonu u owiec w różnych stanach fizjologicznych, poddanych poszczególnym działaniom doświadczalnym.

Podobnie krótka (21 stronic) ale zwięzła Dyskusja, zwieńczona Wnioskami, stanowi opis i interpretację uzyskanych wyników na tle bogato cytowanego i starannie interpretowanego piśmiennictwa, z jednoczesnym zachowaniem rezerwy co do znaczenia własnych osiągnięć.

Rozprawę dokumentuje 261 pozycji piśmiennictwa, w dużej części (prawie 1/3) powstałego już w bieżącym stuleciu. Autorka nie waha się również sięgać do prac podstawowych w tej dziedzinie, takich np. jak już historyczne badania nad neurohormonalnymi aspektami działania stresu u owiec, które zespół prof. E. Domańskiego oraz promotor rozprawy, prof. F. Przekop, wielokrotnie publikowali od lat 70. ubiegłego wieku, dokumentując w ten sposób czynne uczestnictwo tej placówki w tworzeniu nowoczesnej neuroendokrynologii.

Warto podkreślić, że prezentowane w rozprawie wyniki były w częściach publikowane, wchodząc w skład 4 prac już wydrukowanych w dobrych czasopismach z Listy Filadelfijskiej oraz jednej przyjętej do druku – świadcząc tym samym o ich znaczącej wartości naukowej.

2. Uwagi szczegółowe

Założeniem rozprawy doktorskiej mgr Magdy Ciechanowskiej było, jak to już zostało wspomniane, kompleksowe spojrzenie na molekularny mechanizm funkcjonowania osi HPG owiec i jego modyfikacje w różnych stanach fizjologicznych. Zgodnie z nim – Autorka rozpoczęła swój wywód (Wstęp) od scharakteryzowania cząsteczki GnRH i dróg neuronalnych, doprowadzających informację do obszarów OUN, skupiających neurony GnRH-ergiczne. Następnie przeprowadziła analizę czynników, modyfikujących aktywność osi HPG; rozpatrywała przede wszystkim fotoperiod, jako czynnik zmieniający u samic badanego gatunku czynność gonad, które zwrotnie wpływają na funkcjonowanie osi HPG oraz stres, będący potężnym, wieloczynnikowym modulatorem większości czynności życiowych organizmu, z funkcjami rozrodczymi na czele.

Po takim przygotowaniu – można było wyartykułować cele podjętych badań. Było nimi określenie u owiec rasy Merynos Polski współzależności pomiędzy ekspresją genów gonadoliberyny GnRH i jej receptora (GnRH-R) w strukturach osi podwzgórzowo-przysadkowej w zależności od fazy cyklu estralnego, rodzaju działającego stresu oraz

obecności lub braku działania czynników hamujących uwalnianie GnRH/LH (czyli w warunkach pobudzania lub blokowania układu endorfinowego i CRH-ergicznego).

Mamy więc przed sobą wyniki klasycznych doświadczeń fizjologicznych, wzbogaconych nowoczesną metodologią molekularną, przeprowadzonych na 60 owcach, czyli na gatunku, będącym od lat obiektem finezyjnych badań, prowadzonych Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonnie. Podkreślam to dlatego, że mamy gwarancję, udokumentowaną licznymi, od lat powstającymi znakomitymi publikacjami pochodzącymi z tego ośrodka, iż eksperymenty były prowadzone w należytych warunkach, z zachowaniem wszelkich reguł pracy ze zwierzętami pozostającymi w ostrym eksperymencie. Mam taką pewność, mimo braku informacji o aprobacie tych doświadczeń przez Lokalną Komisję Etyczną – zresztą bez jej posiadania niemożliwe byłoby opublikowanie wyników, a to wszakże miało już miejsce (ale jej niezamieszczenie jest jednym z nielicznych uchybień redakcyjnych doktorantki) .

Metodyka pracy jest nowoczesna, a obejmuje zarówno precyzyjną neurochirurgię owiec w różnych stadiach cyklu estralnego, następne wielogodzinne ich traktowanie infuzjami domózgowymi i szokami elektrycznymi (stres krótkotrwały, czyli łagodne i przerywane impulsy elektryczne aplikowane na przednie kończyny jednego dnia przez 3 godziny oraz analogiczny, lecz stosowany chronicznie czyli trwający po 5 godzin dziennie przez 4 kolejne dni doświadczalne), aby w toku tych długotrwałych doświadczeń pobierać krew, a po ich zakończeniu - poszczególne struktury mózgowe, będące następnie przedmiotem analiz molekularnych. Metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym analizowano ekspresję genu GnRH i jego receptora oraz genu referencyjnego dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) w poszczególnych strukturach OUN (obecność i ilość mRNA, wyrażona w jednostkach umownych), zaś w krwi badano metodą RIA poziom gonadotropiny LH, będącej wskaźnikiem stanu funkcjonalnego osi HPG.

Po przeprowadzeniu tych wszystkich badań i szczegółowej analizie wyników Autorka wykazała, że:

i - mRNA genu kodującego GnRH wykryto w obszarze przedwzrokowym oraz w przednim i brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu we wszystkich wariantach doświadczenia, natomiast w żadnej z faz cyklu estralnego badanych owiec nie dochodzi do ekspresji tego genu w przedniej przysadce i wyniosłości pośrodkowej;

ii – w przeciwieństwie do tego – we wszystkich badanych strukturach wykryto mRNA genu kodującego receptor GnRH, a wielkość ekspresji obu genów zawsze była wyższa u owiec w fazie ciałka żółtego i prawie zawsze w fazie pęcherzykowej, niż u osobników anestralnych;

iii – w obydwu aktywnych fazach cyklu zarówno poziom jak i częstotliwość pulsów gonadotropiny LH w surowicy owiec były wyższe niż w *anestrus*, zaś amplituda pulsów pozostawała bez zmian;

iv – obydwa rodzaje zastosowanego stresu stymulowały u anestralnych owiec ekspresję obydwu genów. Gen GnRH był eksprymowany najsilniej w obszarze przedwzrokowym zaś jego receptor – w brzusznym podwzgórzu po zastosowaniu stresu przedłużonego;

v – w fazie pęcherzykowej tylko stres krótkotrwały stymulował, zaś przedłużony - hamował pojawianie się transkryptu obydwu genów we wszystkich badanych strukturach;

vi – stres krótkotrwały tylko nieznacznie (acz istotnie statystycznie) podwyższał zaś przedłużony – obniżał w podobnym zakresie poziom LH w krwi, nie wpływając ani na częstotliwość ani na amplitudę jej pulsów;

vii – dokomorowa infuzja agonisty CRH lub β-endorfiny obniżała zaś obecność blokera CRH pobudzała ekspresję obydwu badanych genów. Nalokson, antagonista

opioidowy nie wpływał na ilość ani transkryptu GnRH ani jego receptora. Analogiczny był wpływ badanych czynników na poziom i częstotliwość pulsów surowiczej gonadotropiny LH;

viii – nieco na uboczu głównego wątku badań pozostaje wykrycie w przedniej przysadce owiec w fazie pęcherzykowej obecności fragmentu mRNA dłuższego o ok. 20 par zasad od badanej I formy GnRH.

W inteligentnie poprowadzonej Dyskusji Autorka konfrontuje uzyskane wyniki z piśmiennictwem, zwracając jednocześnie uwagę, że o ile ekspresja genu kodującego GnRH w podwzgórzu owiec była dotychczas przedmiotem nielicznych badań, to w odniesieniu do jego receptora Jej badania mają charakter pionierski. Ma także świadomość, że na podstawie przeprowadzonych analiz można jedynie domniemywać, jakie mechanizmy regulacyjne zostały uruchomione w poszczególnych wariantach doświadczenia, doprowadzając do zaobserwowanych zmian w ekspresji badanych genów. Nie zapomina przy tym, że ekspresja genu jest warunkiem koniecznym, ale nie wystarczającym do tego, aby produkt tej ekspresji ostatecznie ujawnił swoją funkcję fizjologiczną. Abstrahując od całej gamy możliwych procesów post-transkrypcyjnych – obecność w krwi badanych owiec gonadotropiny LH i modyfikacje jej pulsacyjnego wydzielania dowodzą, że transkrypcja genu GnRH zakończyła się wytworzeniem funkcjonalnego neurohormonu a jego receptor w gonadotropach przysadkowych odebrał tę informację na tyle skutecznie, że hormon został wydzielony. Wszystkie inne oddziaływania, łącznie z możliwością desensytyzacji receptora GnRH przez funkcjonalny neurohormon, jego działania jako neurotransmitera a także uwzględniając rolę receptora GnRH w podwzgórzu jako potencjalnego regulatora ekspresji genu neurohormonu - pozostają w sferze domniemań, opartych o bogato cytowane piśmiennictwo.

Na koniec Autorka zamieszcza 6 wniosków, będących raczej skromnym podsumowaniem uzyskanych wyników. Zwraca w nich uwagę na zależność poziomu ekspresji badanych genów kodujących głównych aktorów osi HPG od miejsca ich lokalizacji w strukturach OUN i przysadce oraz stanu fizjologicznego badanych owiec. Ten 'stan fizjologiczny' to nie tylko fazy cyklu estralnego, ale także stres, który w znacznym stopniu modyfikuje także poziom gonadotropiny LH w osoczu, a konsekwencją jego działania mogą być zakłócenia funkcji rozrodczych poprzez wpływ na biosyntezę GnRH i jej receptora. Zabrakło mi tu zwrócenia uwagi na wykrycie ekspresji genów, kodujących neurohormon GnRH i jego receptor w strukturach mózgowych niezwiązanych bezpośrednio z regulacją osi HPG, a także odniesienia do wykrytej u estralnych owiec drugiej formy GnRH, co jest osiągnięciem ważnym acz raczej trudnym do skomentowania.

3. Uwagi krytyczne

Ponieważ zadaniem recenzenta jest wyszukanie i ocena zarówno mocnych stron ocenianej pracy jak i jej słabości, skupię się teraz na wyliczeniu tych nielicznych potknięć Autorki, które wydają mi się istotne:

i - przedstawiając cząsteczkę GnRH (str. 17) Autorka pisze, że zawiera ona (cyt.) ..."na końcu karboksylowym grupę aminową (Rys. 1.1)...". Jest to chyba przejęzyczenie?

ii – str. 37 – w opisie przebiegu eksperymentu brak informacji o tym, w jaki sposób i w jakim przedziale czasowym w stosunku do zakończenia doświadczenia (infuzje, stres) zwierzęta były zabijane; nie określono także pory doby, w której odbywało się pobieranie materiału autopsyjnego do dalszych analiz;

iv – str. 38 – objętość pobranej krwi: ... „próbki krwi pobierano w odstępach 10-minutowych przez 5 kolejnych godzin po 4 ml każda" – oznacza to, że w toku każdego

doświadczenia pobierano od pojedynczej owcy co najmniej 120 ml. Jaką to stanowiło część ogólnej objętości krwi (nie podano też masy ciała owiec) – czy ten ubytek krwi był uzupełniany płynem fizjologicznym? – jeśli nie, to czy nie rzutował na stężenie badanych hormonów w poszczególnych (zwłaszcza końcowych) fazach doświadczenia?

v – pomimo wyodrębnienia w Dyskusji podrozdziałów, w których Autorka omawia uzyskane wyniki w kontekście dostępnych danych z piśmiennictwa – czytelnikowi jest ogromnie trudno dokonać rozróżnienia, których danych: własnych wyników czy doniesień innych autorów, dotyczą poszczególne rozważania. Często używane sformułowanie: „wyniki przeprowadzonych badań" zdaje się kierować uwagę do wyników własnych – tymczasem przeważnie na końcu zdania lub akapitu znajdujemy odnośnik do literatury. Taki zabieg redakcyjny ma raczej charakter (zbędnie) maskujący niż eksponujący bardzo ciekawe wyniki własne Autorki;

vi – w kilku miejscach Dyskusji, np. str. 97, 103 (a także we Wnioskach – wniosek 3) Autorka mówi o wykazaniu „dodatniej korelacji" między ekspresją genów gonadoliberyny GnRH i jej receptora a zmianami stężeń LH – takie sformułowanie wydaje się być pewnym uproszczeniem, bowiem Autorka nie dokonywała tego typu analizy statystycznej (zastosowany układ doświadczalny moim zdaniem nie stwarza takiej możliwości) – należałoby więc raczej mówić o proporcjonalności zmian lub jednakowym ich kierunku;

vii – trudno mi jest sobie wyobrazić, w jaki sposób (cyt. str. 104) ... „receptor GnRH (..) wpływa na ekspresję genu GnRH (..) i kontroluje aktywność sekrecyjną układu GnRH/LH i uwalnianie gonadotropin". Chętnie poznam, podczas publicznej obrony, stanowisko doktorantki w tej kwestii.

4. Wnioski końcowe

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane rozprawom 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. Podjęte w niej badania należą do nielicznych, rozpatrujących molekularne aspekty funkcjonowania osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej u owiec i jej zależności od stanu fizjologicznego (cykl estralny, stres o różnym nasileniu i czasie trwania). Opublikowanie obszernych fragmentów rozprawy w recenzowanych czasopismach naukowych dowodzi, że uzyskane wyniki mają już znaczącą pozycję wśród znawców zagadnienia. Ich zaletą jest także stawianie nowych pytań, dotyczących post-transkrypcyjnych mechanizmów, zaangażowanych w regulację powstawania funkcjonalnej gonadoliberyny GnRH i jej receptora w poszczególnych strukturach osi HPG. Otwierają one perspektywy dalszych badań o charakterze nie tylko poznawczym ale także aplikacyjnym.

Przeto z najgłębszym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonnie o dopuszczenie **mgr Magdaleny Olgi Ciechanowskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego, na podstawie rozprawy, zatytułowanej: **EKSPRESJA GENÓW GnRH i RECEPTORA GnRH W UKŁADZIE PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWYM OWCY W RÓŻNYCH STANACH FIZJOLOGICZNYCH; WPŁYW CZYNNIKÓW STRESOGENNYCH.**

Prof. dr hab. Krystyna Skwarło-Sońta

Warszawa, 8 czerwca 2009