



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 LHβ mRNA. Na str. 18 Autorka podaje „*Względny poziom ekspresji mRNA dla podjednostki LHβ 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 LHβ 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.

