

Prof. dr hab. Stanisław Okrasa
Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
UWM w Olsztynie
10-718 OLSZTYN
ul. Oczapowskiego 1A

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

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Elżbiety Marciniak została wykonana w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie, pod kierunkiem prof. dr. hab. Tomasza Misztala. Na rozprawę doktorską składają się dwie – niżej wyszczególnione – prace oryginalne, opublikowane w języku angielskim w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania IF wynosi 3,63 a punktacja wg MNiSW – 60.

1. **Marciniak E.**, Górski K., Hasiec M., Misztal T. 2016. Hypothalamic-pituitary GnRH/LH axis activity is affected by salsolinol in sheep during lactation: effects of intracerebroventricular infusions of salsolinol and its antagonizing analogue. *Theriogenology*; 86, 1931-1938. (IF₂₀₁₆ – 1,986; MNiSW – 30 pkt.)
2. **Marciniak E.**, Hasiec M., Fülöp F., Misztal T. 2016. 2017. Salsolinol – a potential inhibitor of the gonadotropic axis in sheep during lactation. *Domestic Animal Endocrinology*; 58, 97-103. (IF₂₀₁₆ – 1,644; MNiSW – 30 pkt.)

Badania przedstawione w powyższych pracach były finansowane w ramach projektu badawczego MNiSWN N311 082037. Udział Doktorantki w realizacji tych badań był znaczący i wynosił 65-68%, co zostało potwierdzone przez współautorów w załączonych oświadczeniach. Rozprawa doktorska mgr Elżbiety Marciniak, oprócz kopii ww. publikacji, zawiera *Autoreferat*, obejmujący: *Streszczenia* pracy w języku polskim i angielskim, *Wstęp* przedstawiający ogólne informacje dotyczące funkcjonowania osi GnRH/LH ze szczególnym uwzględnieniem regulacji jej aktywności sekrecyjnej u owiec w okresie laktacji oraz charakterystykę salsolinolu – jego biosyntezę w mózgu i udział w kontroli wydzielania hormonów przysadkowych (głównie prolaktyny), jak również – *Hipotezę badawczą i cele pracy*, *Opis doświadczeń*, *Opis wyników doświadczeń* oraz *Dyskusję* im poświęconą, *Wnioski* i zestawienie cytowanego piśmiennictwa. W opracowaniu zamieszczono także wykaz używanych skrótów oraz stosowne oświadczenia – Autora pracy, Promotora pracy i Współautorów publikacji.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oceniana rozprawa doktorska jest poświęcona wyjaśnieniu roli salsolinolu w regulacji aktywności sekrecyjnej układu GnRH/LH u owcy w okresie laktacji. Salsolinol – to pochodna dopaminy, syntetyzowana w układzie dopaminergicznym. Miejsca wiążące salsolinol m.in. zidentyfikowano w podwzgórzu, wyniosłości pośrodkowej (ME) oraz przedniej i tylnej części przysadki. We wcześniejszych badaniach, prowadzonych m.in. przez Zespół Profesora Tomasza Misztala, dobrze wyjaśniono stymulujące działanie salsolinolu, zarówno na uwalnianie, jak i na sekrecję prolaktyny oraz powiązanie tego oddziaływania z aktywnością endogenego systemu opioidowego. W piśmiennictwie naukowym, opisano wiele badań wyjaśniających udział układu dopaminergicznego w regulacji aktywności systemu GnRH/LH u różnych gatunków. W tym momencie należy także wspomnieć, iż wieloletni wkład fizjologów z IFiZZ im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie w poznanie funkcjonowania systemu GnRH/LH u owiec, w tym także roli dopaminy w regulacji jego aktywności, jest znaczący i dobrze znany specjalistom na świecie, badającym ten problem. Wracając do salsolinolu, jego zaangażowanie w regulację systemu GnRH/LH u samic nie było przedmiotem wcześniejszych badań. Wiadomo jednak, że ssanie wpływa hamująco na sekrecję GnRH/LH i równocześnie powoduje wzrost koncentracji salsolinolu w podwzgórzu u owiec. W prezentowanej rozprawie doktorskiej przyjęto zatem hipotezę badawczą zakładającą, że salsolinol moduluje aktywność sekrecyjną układu GnRH/LH u owcy w okresie laktacji. W celu zweryfikowania powyższej hipotezy, Doktorantka wykonała cztery doświadczenia, które miały na celu:

- określenie wpływu podawania związku, antagonizującego działanie salsolinolu (1-MeDIQ; 1-metylo-3-4-dihydrozochinoliny), do III komory mózgu na uwalnianie GnRH w ME i LH do krwi obwodowej u owiec w piątym tygodniu laktacji;
- sprawdzenie działania salsolinolu, podawanego do III komory mózgu, na uwalnianie LH do krwi obwodowej i ekspresję genu podjednostki β LH w przednim płacie przysadki u owiec, 48 godz. po odsadzeniu potomstwa;
- określenie wpływu podawania związku, antagonizującego działanie salsolinolu, do jądra lejka/wyniosłości pośrodkowej (IN/ME) na uwalnianie GnRH do CSF i LH do krwi obwodowej u owiec w piątym tygodniu laktacji;
- sprawdzenie wpływu salsolinolu na uwalnianie LH oraz ekspresję genu podjednostki β LH w komórkach przedniego płata przysadki owiec, w warunkach *in vitro*, 48 godz. po odsadzeniu potomstwa.

Wybór problematyki badawczej należy uznać za trafny, gdyż w pełni uzasadnione jest względami merytorycznymi dążenie do poznania możliwości oddziaływania salsolinolu na aktywność układu GnRH/LH w kontekście wcześniej wykazanego wpływu tego związku na sekrecję prolaktyny u owiec w okresie laktacji. Badania przeprowadzono na 30 samicach owcy rasy polska długowłnista. W procedurze przeprowadzonych badań, na podkreślenie zasługuje testowanie działania salsolinolu (w doświadczeniu 2 i 4) oraz związku o właściwościach antagonistycznych (w doświadczeniu 1 i 3) w warunkach *in vivo*, stosując ich infuzje do III komory mózgu i/lub do obszaru IN/ME owiec, jak również sprawdzenie

w warunkach *in vitro* wpływu salsolinolu na ekspresję genu podjednostki β LH w komórkach przedniego płata przysadki badanych zwierząt i wydzielanie LH. W doświadczeniach z zastosowaniem salsolinolu (*in vivo* i *in vitro*), w których oznaczano ekspresję genu podjednostki β LH wskazane byłoby także określenie poziomu ekspresji receptora GnRH. Wyniki takiej analizy mogłyby być użyteczne w interpretacji uzyskanych wyników. Generalnie, zastosowane w badaniach procedury eksperymentalne i analityczne oceniam bardzo pozytywnie.

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Elżbiety Marciniak dostarczyły kilka bardzo interesujących obserwacji. Spośród nich na szczególne wyróżnienie zasługuje:

- obniżenie stężenia GnRH w perfuzatach obszaru IN/ME (uzyskanych metodą *push-pull*) jak i stężenia LH we krwi obwodowej badanych owiec (bez zmiany parametrów pulsacyjnego wydzielania tego hormonu) wskutek podawania (w piątym tygodniu laktacji) do III komory mózgu związku antagonizującego działanie salsolinolu (1-MeDIQ);
- wzrost średniego stężenia LH w krwi obwodowej badanych owiec i wzrost częstotliwości pulsów w wydzielaniu tego hormonu (bez zmian stężenia GnRH w CSF), pod wpływem podawania im (w piątym tygodniu laktacji) do obszaru IN/ME związku antagonizującego działanie salsolinolu (1-MeDIQ);
- wzrost stężenia LH w krwi obwodowej owiec pod wpływem podawania (po 48 godz. od zakończenia 8-tygodniowego okresu odchowu jagniąt) salsolinolu do III komory mózgu, któremu towarzyszył wzrost amplitudy pulsów w wydzielaniu tego hormonu;
- obniżenie wydzielania LH *in vitro* w obecności salsolinolu przez eksplanty gruczołowej części przysadki, pobierane od owiec po 48 godz. od zakończenia 8-tygodniowego okresu odchowu jagniąt (bez zmian w ekspresji genu podjednostki β LH).

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań są bardzo interesujące i do pewnego stopnia zaskakujące. Świadczą one o złożoności mechanizmów regulujących aktywność sekrecyjną systemu GnRH/LH. Wpływ zarówno salsolinolu, jak i jego antagonisty, na badane parametry aktywności systemu GnRH/LH zdecydowanie zależał od miejsca podania/działania tych związków. Przykładowo, podanie związku antagonizującego działanie salsolinolu (1-MeDIQ) do III komory mózgu wywołało przeciwstawne zmiany w stężeniu LH we krwi obwodowej (obniżenie) w porównaniu ze zmianami zanotowanymi po podaniu go do obszaru IN/ME (wzrost). Podobnie, wpływ salsolinolu na wydzielanie LH był przeciwstawny po podaniu go *in vivo* do obszaru IN/ME (wzrost) w porównaniu z bezpośrednim jego działaniem na komórki przedniego płata przysadki w warunkach *in vitro* (obniżenie). Takie obserwacje mogą stanowić odpowiedni materiał do interesującej dyskusji, jak i podstawę do planowania dalszych badań zmierzających do wyjaśnienia roli salsolinolu w regulacji aktywności systemu GnRH/LH.

W dyskusjach zamieszczonych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i *Autoreferacie* podjęto wnikliwą analizę i interpretację prezentowanych wyników.

Doktorantka rozpatruje możliwość bezpośredniego i pośredniego oddziaływania salsolinolu na aktywność sekrecyjną systemu GnRH/LH. Stwierdza m.in., iż pośrednictwo innych systemów neuralnych w tej relacji na poziomie OUN wydaje się być uzasadnione faktem znacznego oddalenia miejsca największego skupiska neuronów GnRH-ergicznym (POA) od miejsca występowania wysokiego stężenia salsolinolu w podwzgórzu laktujących owiec. Na podstawie dostępnego piśmiennictwa, do czynników które potencjalnie mogłyby pośredniczyć w powyższym działaniu salsolinolu, Doktorantka w pierwszej kolejności zalicza: endogenne peptydy opioidowe (EOP), neuropeptyd Y oraz dopaminę i wiąże ich potencjał do hamowania systemu GnRH/LH z wyciszeniem aktywności osi HPG w okresie anestrus laktacyjnego. Z kolei, stymulujące działanie salsolinolu – podawanego do trzeciej komory mózgu – na aktywność osi gonadowej mogłoby wynikać z blokowania hamującego wpływu EOP na tę oś przez salsolinol wskutek możliwości wiązania się go z receptorami opioidowymi typu μ i ograniczania dostępności peptydom opioidowym do tych receptorów. W tym przypadku, Doktorantka dopuszcza także możliwość stymulacji aktywności systemu GnRH/LH przez neurony kisspeptynowe, których aktywność może wzrastać w następstwie obniżenia aktywności systemu dopaminergicznego przez egzogenne salsolinol (podawany do III komory). W oparciu o wcześniejsze badania innych autorów, Doktorantka wskazuje także możliwość oddziaływania salsolinolu (podawanego do III komory) na aktywność systemu GnRH/LH za pośrednictwem komórek glejowych – tanocytów, które mogą uczestniczyć w kontroli uwalniania GnRH w obszarze wyniosłości pośrodkowej. Na uwagę zasługuje krytyczna analiza przyczyn braku pulsacyjnych zmian w koncentracji GnRH w płynie mózgowo-rdzeniowym. Zdaniem Doktorantki, w tym przypadku, decydujące znaczenie mógł mieć długi okres kolekcji prób płynu (30 min) oraz duża zmienność między osobnikami i badanymi grupami zwierząt. Na podstawie eksperymentu przeprowadzonego w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem eksplantów przedniego płata przysadki, w którym stwierdzono hamujący wpływ salsolinolu na wydzielanie LH, Doktorantka słusznie wskazuje możliwość bezpośredniego działania salsolinolu na komórki gonadotropowe, ale – na szczęście – nie posuwa się zbyt daleko w tym rozumowaniu i stwierdza konieczność przeprowadzenia dalszych badań w celu wyjaśnienia mechanizmu oddziaływania salsolinolu na wydzielanie LH na poziomie przysadki.

W zakończeniu *Autoreferatu* zamieszczono trzy ogólnie sformułowane wnioski, podsumowujące badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej. Mam uwagę do drugiego wniosku, w którym wskazano możliwość bezpośredniego i pośredniego modulującego działania salsolinolu na sekrecję GnRH i LH. Jednakże sugestie zamieszczone w nawiasach, że działanie bezpośrednie oznacza wpływ hamujący, a pośrednie – wpływ stymulujący oparte są na spekulacji, ponieważ domniemane bezpośrednie działanie salsolinolu (np. na poziomie przysadki) nie zostało doświadczalnie zweryfikowane, a w przypadku działania pośredniego, nie znając pośrednich ogniw, trudno przewidzieć końcowy efekt. Teoretycznie może on przyjmować charakter zarówno stymulujący jak i hamujący. Tak więc, powyższe stwierdzenia jako hipotezy są oczywiście do przyjęcia, ale chyba przedwcześnie trafiły one do wniosków. W *Autoreferacie*, Doktorantka cytuje liczne piśmiennictwo (141 pozycji), co – wobec ograniczonej przez redakcję możliwości

cytowania prac w publikacjach – pozwoliło Doktorantce wykazać się gruntowną znajomością problematyki związanej z tematem przedstawionej rozprawy doktorskiej.

INNE UWAGI i PYTANIA

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Marciniak były wcześniej pozytywnie ocenione przez recenzentów wyznaczonych przez redakcje czasopism naukowych. W związku z tym nie mam uwag krytycznych do ich formy i treści. Pozwolę sobie jednak na kilka dodatkowych uwag/pytań odnoszących się do opracowania *Autoreferatu* lub problematyki podjętej w rozprawie.

1. W *Autoreferacie* często używane jest określenie *przysadka mózgowa*. Wcześniej termin ten był powszechnie używany, jednak od szeregu lat zaleca się – tak jak w języku angielskim – stosowanie formy skróconej nazwy tego gruczołu, tj. *przysadka*.
2. Czym uzasadnione było stosowanie (publikacja 1) zróżnicowanego wzorca podawania do III komory mózgu salsolinolu (pięć 30-min infuzji z 30-min interwałami) i jego analogu o właściwościach antagonistycznych (cztery 30-min infuzje z 30-min interwałami).
3. W *Autoreferacie* jest krótka wzmianka o występowaniu kwasu γ -aminomasłowego (ważnego neuroprzekaźnika o działaniu hamującym) w neuronach dopaminergicznych, mających zakończenia w ME. Ta informacja robi wrażenie niedokończonej. Domyślam się o co chodziło w niej Doktorantce, ale dla pełnej jasności proszę o uzupełnienie podjętego wątku.
4. Przeprowadzone przez Panią badania po raz pierwszy zmierzały do wyjaśnienia roli salsolinolu w regulacji aktywności systemu GnRH/LH. W takiej sytuacji, uzyskane wyniki z reguły nasuwają szereg kolejnych pytań. Tak też było w przypadku badań przedstawionych w Pani rozprawie doktorskiej, o czym świadczy napisana przez Panią *Dyskusja*, dotycząca uzyskanych wyników. Jaki problem badawczy, który wyłonił się z Pani badań, uważa Pani za najbardziej interesujący i zasługujący na wyjaśnienie w pierwszej kolejności (dlaczego?).

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu należy stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Elżbiety Marciniak zawiera nowe i wartościowe dane, które wskazują na udział salsolinolu w modulacji aktywności systemu GnRH/LH u owiec w okresie anestrus laktacyjnego/sezonowego. Wykazano w niej znaczenie miejsca podania/działania salsolinolu, lub związku o właściwościach antagonistycznych, m.in. dla efektu końcowego ich oddziaływania na wydzielanie LH, tj. stężenie tego hormonu we krwi lub medium hodowlanym. Przeprowadzenie powyższych badań wymagało zastosowania złożonych procedur doświadczalnych oraz dużego nakładu pracy. Z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska prezentuje wysoki poziom naukowy, a Doktorantka wykazała się w niej bardzo dobrym

opanowaniem warsztatu badawczego i dobrą znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań.

WNIOSEK KOŃCOWY

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa zatytułowana **”Salsolinol jako modulator aktywności sekrecyjnej układu GnRH/LH u owcy w okresie laktacji”** spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie nr 595 o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14.03.2003 r. (wraz z późniejszymi zmianami) – stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie z wnioskiem **o dopuszczenie mgr Elżbiety Marciniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Olsztyn 16.10.2017 r.



Stanisław Okrasa