

Prof. Tadeusz Krymowski
ul. F. Mitynka 1
10-756 Olsztyn

Olsztyn 10.08.2014

O c e n a

rozprawy doktorskiej mgr Marii Romerowicz-Misielak zatytułowanej:

„Wpływ tlenu węgla na ekspresję genów gonadotropin i gonadoliberyny w centralnym układzie nerwowym świniodzik w okresie lata i zimy”

Niżej przedstawioną ocenę wykonałem na zlecenie Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego wyrażone w piśmie z dnia 17 czerwca 2014 r.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska jest oprawionym wydrukiem komputerowym, zawartym na 107 stronach, który obejmuje tekst, napisany w układzie typowym dla prac naukowych, oraz 26 barwnych, starannie wykonanych ilustracji (nazwanych rysunkami, tabelami lub wykresami), i cytowanych w tekście rozprawy 261 pozycji piśmiennictwa.

Rozprawę doktorską zaliczam do prac badawczych, o charakterze badań podstawowych, w zakresie nauk o życiu, a ściślej w zakresie fizjologicznych regulacji wpływu środowiska na organizm zwierząt i człowieka.

Prezentuję pogląd, że w badaniach podstawowych w obszarze nauk o życiu, młody badacz, podejmujący pracę doktorską, nie ma kwalifikacji ani możliwości, aby samodzielnie nakreślić cele i zadania badawcze. Tę rolę spełnia zawsze promotor. Doktorantka miała szczęście, że jej promotorem jest profesor, który wcześniej wykrył wraz ze współautorami i opublikował niezwykle interesujące zjawisko, iż w oku wytwarzany jest tlenek węgla w stężeniu zależnym od pory dnia i pory roku, i że wytworzony tam tlenek węgla poprzez krew i odpowiednie naczynia krwionośne przedostaje się lokalnie do krwi tętniczej zaopatrującej mózg. To bardzo interesujące odkrycie umożliwiło innym autorom podjęcie dalszych badań, których głównym celem było poszukiwanie mechanizmów działania tlenu węgla jako regulatora i gazowego transmittera już w obszarze mózgu. Zaistniała potrzeba skoncentrowania poszukiwań na poziomie molekularnym i szukanie odpowiedzi poprzez badanie genetycznych uwarunkowań sekrecji czynników regulacyjnych w różnych strukturach mózgu. Fragment takich badań przydzielił promotor, jak rozumiem, doktorantce.

Badania podstawowe o charakterze odkrywczym zostały przez promotora, z udziałem już doktorantki sformułowane, zaplanowane, podjęte i przez doktorantkę wykonane.

W tym świetle trochę niezręczne jest sformułowanie na str.30 pracy zdanie: *„Własna hipoteza badawcza zakłada, że w warunkach fizjologicznych odpływający z oka w krwi żyłnej tlenek węgla może być bezpośrednio transportowany do mózgu poprzez przeciwną przepływową przenikanie w obszarze splotu około przysadkowego do naczyń tętniczych zaopatrujących mózg, a sezonowo zmienne stężenie tlenu węgla w krwi żyłnej odpływającej z oka może nieść informację o warunkach oświetlenia.”* Rozumiem intencje autorki, która utożsamia się z zespołem i „własną” nazywa hipotezę promotora i zespołu badawczego, w którym oczywiście uczestniczyła. Brzmi to trochę nieprawdźliwie, gdyż jakby sugeruje, iż wcześniej opublikowana hipoteza, była jej

własną hipotezą. Jest to jednak drobny fragment, który dla porządku odnotowuję, ale który nie ma znaczenia w ocenie rozprawy.

W ocenianej pracy na szczególne podkreślenie zasługują stosowane metody badawcze, w mojej ocenie, pięknie wykonanego doświadczenia fizjologicznego.

Podstawowym zadaniem autorki było poszukiwanie w mózgu i przysadce mózgowej skutków infuzji do okołoprzysadkowej, żylniej zatoki jamistej:

- tlenku węgla, podanego w tzw. autologicznym, czyli własnym osoczu krwi,
- lub tlenku węgla doświadczalnie wytworzonego we krwi płynącej do żylniej zatoki jamistej, poprzez odpowiednie naświetlenie infundowanej krwi.

Aby śledzić powstające pod wpływem infundowanego tlenku węgla zmiany w odpowiednich strukturach mózgu i przysadki mózgowej wykonano, w mojej ocenie, niezwykle trudne doświadczenie, w którym świni, bez przerwy przez 48 godzin, podawano pompą infuzyjną do wcześniej skaniulowanej żyłki grzbietowej nosa:

- autologiczne osocze o fizjologicznym stężeniu tlenku węgla,
- autologiczne osocze o zwiększonym stężeniu tlenku węgla,
- krew, naświetlaną w czasie jej przepływu odpowiednio skonstruowaną lampą, emitującą światło o określonej długości fal świetlnych, co powodowało wzrost stężenia tlenku węgla we krwi.
- krew nie naświetlaną w czasie jej przepływu a więc z fizjologicznym stężeniem tlenku węgla.

Ten bardzo trudny zabieg ciągłej infuzji dożylniej przez 48 godzin, i pobierania w tym czasie co 2 godziny krwi z odpowiednich naczyń od żywej świni, której nie podawano żadnych środków usypiających lub uspakajających, komplikował dodatkowo fakt, że w nocy należało wszystkie czynności wykonywać przy lampie o przyciemnionym świetle czerwonym, posługując się jedynie w miarę koniecznej potrzeby, jak to określiła autorka pracy, „małą elektryczną latarką”.

Rozumiem, że tak trudne technicznie 48 godzinne doświadczenia na żywych, przebywających bez narkozy w warunkach fizjologicznych świniodzikach, nie wykonywała pojedyncza osoba, czyli autorka rozprawy doktorskiej, a zespół zapewne kilkusobowy, którego autorka rozprawy była częścią. Jednakże pragnę podkreślić, że na pewno w Polsce, a jestem przekonany że i na świecie, nie ma odpowiednich warunków i możliwości, aby tak zaplanowane doświadczenie przeprowadzić. W tym miejscu niech mi wolno będzie wyrazić swoje uznanie nie tylko autorce ocenianych badań, ale i innym fizjologom z Rzeszowa, którzy takie

warunki do fizjologicznych badań potrafili zorganizować i w tak zorganizowanych badaniach uczestniczyć.

Skutki wspomnianych 48 godzinnych infuzji badano we krwi obwodowej oznaczając metodą radioimmunologiczną stężenia hormonu luteinizującego (LH), hormonu dojrzewania pęcherzyków jajnikowych (FSH), oraz hormonu melatoniny, we krwi pobieranej przyżyciowo co dwie godziny przez 48 godzin. Te badania i wszystkie dalsze badania oparte o techniki biologii molekularnej wykonywała autorka rozprawy pracując już nie z zespołem lecz samodzielnie.

Finalnym etapem poszukiwań było pośmiertne oznaczanie w odpowiednich skrawkach mózgu ekspresji genów GnRH i genów receptorów GnRH oraz genów podjednostek LH i FSH. Zastosowano metody biologii molekularnej, a więc izolację komórkowego RNA, reakcję odwrotnej transkrypcji i reakcję łańcuchową polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym (Real Time PCR). Skrawki do badań pobierano pośmiertnie z mózgu, z części przedwzrokowej podwzgórza, z części przedniej podwzgórza i części brzuszno-przyśrodkowej podwzgórza oraz z przedniej części przysadki mózgowej.

Wyniki przedstawiono na 19 barwnych i bardzo dobrze opracowanych dydaktycznie tzw. wykresach. Wykresy i opisy analizują dobowe oraz sezonowe (w okresie krótkich i długich dni świetlnych) profile uwalniania do krążenia ogólnego melatoniny, oraz poziomy mRNA genu GnRH i genu receptora GnRH, genu wspólnej podjednostki alfa obu gonadotropin oraz specyficznych podjednostek beta hormonu luteinizującego i folikulotropowego, w trzech różnych strukturach podwzgórza oraz w przedniej części przysadki mózgowej:

- u zwierząt kontrolnych, (którym do zatoki jamistej infundowano autologiczne osocze), oraz
- u zwierząt doświadczalnych, którym do zatoki jamistej infundowano autologiczne osocze o wzbogaconym stężeniu tlenu węgla, bądź krew przepływającą przez system świetlny zwiększający we krwi stężenie tlenu węgla.

Podsumowując wyniki, w dużym skrócie można napisać, że **w badaniach wykazano**, iż wielogodzinna infuzja do zatoki jamistej osocza zawierającego zwiększone stężenie tlenu węgla, lub dopływ krwi żyłnej o zwiększonym stężeniu tlenu węgla, powoduje nie tylko zmiany w stężeniu hormonów gonadotropowych i melatoniny we krwi obwodowej, ale też daleko idące zmiany ekspresji genów GnRH i receptora GnRH, w mózgu oraz zmiany ekspresji genów obu gonadotropin w przedniej części przysadki mózgowej. Zmiany ekspresji genów zależne były od długości dnia świetlnego (zima-lato). Jest oczywiste, że takie zmiany w ekspresji genów hormonów osi podwzgórzowo-przysadkowej muszą pociągać za sobą określone skutki w rozrodzie zwierząt, choć ten wątek nie był przedmiotem badań a był jedynie akcentowany w tekście rozprawy doktorskiej.

Rozdział rozprawy zatytułowany „Dyskusja”, przedstawiony na 12 stronach tekstu, w bardzo logiczny i wielostronny sposób analizuje otrzymane wyniki i odnosi do obszernie cytowanej wiedzy światowej. **Autorka rozprawy wykazała się dobrą znajomością piśmiennictwa światowego i dobrą umiejętnością jego interpretowania w konfrontacji z wynikami własnymi.**

Tekst rozprawy doktorskiej zamykają krótkie rozdziały: „Posumowanie” i „Wniosek”. Treść końcowego wniosku, z którym w pełni się zgadzam cytuję poniżej.

„Tlenek węgla wytwarzany pod wpływem światła w oku dociera drogą przeciwnąprądowego przenikania z obszaru splotu okołoprzysadkowego z naczyń żylnych do tętniczych zaopatrujących bezpośrednio mózg. CO zmienia profil sekrecji melatoniny oraz wpływa na ekspresję genów osi podwzgórzowo-przysadkowej(GnRH, GnRH-R, oraz genów podjednostek gonadotropin LH i FSH) a w konsekwencji na sekrecję hormonów regulujących procesy rozrodcze u samców krzyżówki świni domowej i dzika”.

Uważam, że praca naukowa przedstawiona jako rozprawa doktorska jest pracą poznawczą i odkrywczą, która do wiedzy o regulacjach fizjologicznych w organizmie zwierząt i ich mechanizmie wnosi zupełnie nowe, nieznane dotąd elementy. Wartość tej pracy jest tym bardziej szczególna, że dzięki oryginalnym metodom i technikom badawczym, opracowanym przez fizjologów w Rzeszowie, wśród których jest Pani mgr Maria Romerowicz-Misielak, i dzięki uzyskanym wynikom, rozprawa wnosi nową wiedzę o procesach toczących się w tak trudnym do fizjologicznych badań narządzie jakim jest mózg zwierząt. Przy istniejącym podobieństwie regulacji hormonalnych u zwierząt i człowieka, mam nadzieję, że uzyskane wyniki będą stymulatorem do poszukiwań takich samych, lub podobnych mechanizmów w czynności mózgu człowieka.

Biorąc pod uwagę wyżej przedstawioną ocenę przedkładam wysokiej Radzie wniosek o uznanie przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej Pani Marii Romerowicz-Misielak zatytułowanej „Wpływ tlenu węgla na ekspresję genów gonadotropin i gonadoliberyny w centralnym układzie nerwowym świniodzika w okresie lata i zimy” i wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Marka Koziorowskiego, jako rozprawy doktorskiej spełniającej wymagania ustawowe stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora nauk biologicznych i wnoszę o dopuszczenie mgr Marii Romerowicz-Misielak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze moją bardzo wysoką ocenę przedłożonej mi do zaopiniowania rozprawy doktorskiej wnoszę o jej wyróżnienie.



prof. dr hab. Tadeusz Krzymowski