



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Maria Słomczyńska

Zakład Endokrynologii, Katedra Fizjologii Zwierząt

Instytut Zoologii

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Marii Romerowicz-Misielak pt.:

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

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest opracowaniem ukazującym rolę światła jako krytycznego regulatora procesów fizjologicznych zwierząt. Fotoperiod jest uważany za najważniejszy czynnik synchronizujący cykle reprodukcyjne sezonowo rozmnażających się zwierząt. Aktywność rozrodcza tych zwierząt jest regulowana przez kilka systemów regulacyjnych, które mają początek w siatkówce oka i kończą się w generatorze pulsów GnRH. Sezonowość rozrodu występuje głównie u dzikich gatunków zwierząt i jest wynikiem naturalnej selekcji. Model badawczy zastosowany w pracy doktorskiej to świniodzik- krzyżówka samicy świni domowej i samca dzika europejskiego, u którego został zachowany wyraźny fotoperiodyzm. Za synchronizację funkcji organizmu z cyklicznie zmieniającymi się warunkami oświetlenia (cykl dzień: noc) odpowiedzialny jest zegar biologiczny, w którego skład wchodzi jądro nadskrzyżowaniowe (SCN). Głównym efektem systemu endokrynnego jest szyszynka, gruczoł odpowiedzialny za syntezę melatoniny. Cykliczne zmiany amplitudy stężenia melatoniny w krążeniu ogólnym dostarczają komórkom docelowym informacji o panujących warunkach oświetlenia środowiska. Zaburzenia informacji o warunkach świetlnych uważane są za prawdopodobną przyczynę występowania sezonowych zaburzeń afektywnych (SAD) i trwają poszukiwania cząsteczek biorących udział w tym procesie. W badaniach *in vitro* wykazano, że tlenek węgla może uczestniczyć w molekularnym mechanizmie kontrolującym rytm

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Endokrynologii

tel. 12 664 50 31

fax 12 664 50 98

maria.slomczynska@uj.edu.pl

ms

okołodobowy ssaków, może regulować uwalnianie hormonów podwzgórza i przysadki mózgowej.

Tezy rozprawy doktorskiej Pani mgr Marii Romerowicz-Misielak związane są z najnowszymi trendami w badaniach nad poznaniem precyzyjnych i złożonych mechanizmów leżących u podłoża regulacji procesu rozrodu. Wiedza ta ma kluczowe znaczenie dla rozwoju nowych metod terapeutycznych umożliwiających leczenie obniżonej płodności.

W rozprawie doktorskiej został zachowany układ tradycyjny obejmujący Spis Treści, Wstęp, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusję oraz Wnioski, Streszczenie i Piśmiennictwo.

Wstęp pracy stanowi interesujący przegląd najnowszych informacji dotyczących sezonowości w rozrodzie ssaków. Świniodzik jest szczególnie użytecznym modelem w badaniu mechanizmów sezonowego rozrodu. Został u niego bowiem zachowany, podobnie jak u dzika, wyraźny fotoperiodyzm, natomiast jest zwierzęciem znacznie bardziej łagodnym, co ułatwia przeprowadzanie doświadczeń. Opisanie działania zegara okołodobowego pozwala na wskazanie potencjalnych miejsc akcji czynników zewnętrznych, które mogą mieć wpływ na opóźnianie lub przyspieszanie tego systemu. Autorka pracy przedstawiła zasadę działania niewizualnego przekazu informacji świetlnej z otoczenia do mózgu, kładąc nacisk na rolę fotoreceptorów siatkówki oka. Jednakże fotoperiodyczna regulacja aktywności osi rozrodczej u sezonowo rozmnażających się zwierząt nie jest do końca poznana. W związku z tym uwaga naukowców związana jest z poszukiwaniami cząsteczek, które pełnią rolę receptorów absorbujących światło jak na przykład melanopsyna. Komplementarny do mechanizmu działania melanopsyny jest teoretyczny model „humoralnej fototransdukcji” który proponuje drogę niewizualnego przekazu do mózgu informacji o warunkach świetlnych. Obecne w oku chromofory takie jak hem absorbują fotony i docierając do mózgu niosą informację o aktualnych warunkach świetlnych. Produktem degradacji hemu są równomierne ilości tlenu węgla, jonów żelaza i biliwerdyny. Dotychczasowe wyniki badań nad działaniem CO i jego sezonowo zmiennym stężeniem pozwalają na postawienie hipotezy badawczej, że CO jest jednym z czynników wpływających na aktywność rozrodczą sezonowo rozmnażających się zwierząt.

Celem pracy było ocena wpływu CO, humoralnego czynnika który zmienia się sezonowo i dobowo, na modulację aktywności osi rozrodczej u sezonowo rozmnażających się zwierząt, na modelu krzyżówki świni domowej i dzika. Hipoteza badawcza zakłada, że sezonowo zmienne stężenie tlenu węgla może nieść informacje o warunkach oświetlenia. W oparciu o wieloletnie badania nad drogą przeciwprądowego przenikania prowadzone przez zespół profesora, autorka postanowiła sprawdzić, czy tą drogą powstały w reakcjach CO przekazuje informacje do mózgu. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej są następstwem wykazanej uprzednio zmienności

Pr

sekrecji CO w obszarze oka (Koziorowski i wsp.2013) i mają na celu określenie drogą pośrednią czy CO drogą przenikania przeciwpądowego w zatoce jamistej może bezpośrednio docierać do struktur mózgowych (transport docelowy) i wpływać na regulacje rozrodu u samców.

Część metodyczna pracy nie nasuwa zastrzeżeń, a sposób przedstawienia zasługuje na wysoką ocenę, z małym zastrzeżeniem wyszczególnionym w dalszej części recenzji. Autorka stosując opisane techniki wykonała ogrom pracy, używając do doświadczeń dużych zwierząt, które miały operacyjnie założone kaniule umożliwiające wprowadzanie odpowiednio przygotowanej krwi, a także pobieranie próbek w określonych przedziałach czasowych.

W rozdziale **Wyniki**, Doktorantka skupiła się na przedstawieniu otrzymanych danych ilustrując je 19-ma tablicami. Omówienie wyników i rzeczowa **dyskusja** są przeprowadzone prawidłowo i świadczą o znajomości literatury przedmiotu oraz dojrzałości Doktorantki. Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowany model badawczy (świniodzik), gdzie doświadczenia przeprowadzane *in vivo* umożliwiają zaobserwowanie bezpośredniego wpływu CO na ekspresję wybranych genów. U mieszańców świni domowej i dzika funkcjonuje mechanizm przeciwpądowego przenikania i docelowego transportu tlenu węgla bezpośrednio do struktur mózgu z pominięciem krążenia ogólnego. Zaobserwowane sezonowe zmiany poziomu tlenu węgla powodują zmienność ekspresji genów włączonych w regulację rozrodu w warunkach zmieniającej się długości dnia świetlnego (zima, lato). Doświadczalnie zwiększone stężenie CO we krwi żyłnej odpływającej z oka do żyły zatoki jamistej okołoprzysadkowego kompleksu naczyniowego spowodowało zmiany w poziomie ekspresji genów osi podwzgórze-przysadka (*GnRH*, *GnRH-R*, α , *LH β* , *Fsh β*) samców świniodyka oraz zaobserwowano zmiany poziomu LH w krążeniu ogólnym a także zmiany profilu sekrecji melatoniny.

Po przeczytaniu pracy nasunęło się kilka uwag, które nie wpływają na ocenę merytoryczną.

1. W punkcie opisującym cele pracy zaplanowano sprawdzenie czy fizjologiczna sezonowość aktywacji osi rozrodczej odbywa się na poziomie ekspresji genów. Jaką inną drogę aktywacji rozrodu brała autorka pod uwagę?

2. Przede wszystkim opis doświadczenia jest nieco skrótowy, ponieważ analiza dostępnych danych nie pozwala na zorientowanie się jak szczegółowo została przeprowadzona procedura. Wiemy, że doświadczenie trwało 48 godzin (infuzja osocza), pobierano na początku 50 ml krwi i po odwirowaniu wzbogacano ją CO lub naświetlano LED, a następnie podawano zwierzęciu przez założone wcześniej kaniule. Z żyły szyjnej zewnętrznej pobierano próbki krwi co 2 godziny. Pompa infuzyjna pracowała z szybkością 8,3 ml/ godzinę, więc po 6 godzinach została wykorzystana cała

przygotowana próbka. Z prostej kalkulacji wynikać by mogło, że procedurę taką powtarzano kilkakrotnie (osiem razy) ale nie znalazłam nigdzie takiej informacji.

3. Można było pokusić się na rozszerzenie pracy o analizę steroidów we krwi obwodowej, w której oznaczano stężenie LH, FSH i melatoniny. Nie ulega wątpliwości, że w przyszłości przeprowadzona analiza immunohistochemiczna wybranych białek (przysadki i podwzgórza) może stanowić doskonałe uzupełnienie otrzymanych wyników.

4. We wstępie str 15 użyte zostało określenie **ujemne** kompleksy transkrypcyjne, a lepiej wydaje mi się pisać o **hamujących** kompleksach.

Do **najważniejszych osiągnięć pracy** należy wykazanie, że tlenek węgla wytwarzany pod wpływem światła w oku dociera drogą przeciwpłądowego przenikania w obszarze splotu okołoprzysadkowego z naczyń żylnych do tętniczych zaopatrujących bezpośrednio mózg. Wykazano, że 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.

W ocenianej pracy Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem szerokiego warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na szczególne podkreślenie moim zdaniem zasługuje doskonały dobór literatury, który umożliwia szeroką dyskusję wybranych zagadnień badawczych. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada ważne w pracy badawczej cechy jak pracowitość, solidność i dociekliwość.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **mgr Marii Romerowicz-Misielak pt.: „Wpływ tlenu węgla na ekspresję genów gonadotropin i gonadoliberyny w centralnym układzie nerwowym świniodzika w okresie lata i zimy”** spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie pani mgr Marii Romerowicz-Misielak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie w pełni uzasadniony, moim zdaniem, wniosek o wyróżnienie pracy.