Prof. dr hab. Krystyna Koziec
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy
Kraków

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt **"Wpływ kisspeptyny na oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadową u samic karasia srebrzystego (*Carassius gibelio*, Bloch 1782). Badania *in vivo* i *in vitro*"**

wykonanej przez **mgr inż. Grzegorza Gosiewskiego**

w Katedrze Ichtiobiologii i Rybactwa Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie pod kierunkiem

Pani Prof. dr hab. Mirosławy Sokołowskiej-Mikołajczyk

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne stawiane tego rodzaju pracom naukowym; stanowi zwarte dzieło złożone z XI rozdziałów o łącznej objętości 128 stron maszynopisu. W pracy zacytowano 171 właściwie wybranych publikacji, z których ponad połowa została wydana w ostatnich 10 latach. Wyniki przedstawiono graficznie na 28 rycinach, ponadto dołączono 4 schematy doświadczeń oraz trzy schematy ilustrujące regulację aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej.

Poznanie wszystkich elementów regulacji rozrodu zwierząt wciąż stanowi wyzwanie dla wielu zespołów badawczych, wśród których naukowcy zajmujący się rozrodem ryb są znacznie mniej liczni. W wielu doświadczeniach planowanych dla poznania fizjologii ryb, naukowcy stosują hormony, enzymy, czynniki wzrostowe specyficzne dla ssaków. Takie postępowanie wymuszone

jest brakiem odpowiednich związków występujących tylko u ryb, co jest zrozumiałe, ale jednocześnie może być przyczyną uzyskania wyników trudnych do interpretacji.

Dlatego też uznaję podjęcie przez Doktoranta próby poznania i oceny wpływu podawania kisspeptyny na aktywność osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej karasia srebrzystego za istotne i mogące przyczynić się poszerzenia wiedzy o regulacji rozrodu u ryb.

Kisspeptyna jest 54-aminokwasowym peptydem kodowanym przez gen *KiSS-1* i działającym przez receptor błonowy sprzężony z białkiem G - GPR54. Od czasu odkrycia genu w 1996 roku i scharakteryzowania budowy receptora, a następnie struktury aminokwasowej peptydu, większość badań prowadzono na ssakach, liniach komórkowych, a uzyskane wyniki wykazały udział kisspeptyny w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Stwierdzono, że kisspeptyna i jej mniejsze fragmenty są białkami zaangażowanymi w regulację rozrodu, dojrzewania, nowotworzenia, funkcji nerek, wydzielania insuliny i aldosteronu. Począwszy od 2003 roku i określenia istotnego wpływu kisspeptyny na proces rozrodu u ludzi, wykonano tysiące eksperymentów, których wyniki często były kontrowersyjne, prawdopodobnie z powodu zróżnicowanych warunków doświadczalnych, zmiennych dawek peptydu oraz dróg podawania.

Pan mgr inż. Gosiewski postawił sobie ambitne cele:1. Zbadanie wpływu kisspeptyny na uwalnianie LH z przysadki samic ryb w okresie okołotarłowym i wczesnej odbudowy gonad; 2. Ocenę interakcji kisspeptyny z układem dopaminergicznym; 3. Określenie współzależności peptydu i GnRH w stymulowaniu wydzielania LH z przysadki.

Badania wykonano na 777 rybach w warunkach *in vivo* i *in vitro* w czasie dwóch lat podzielonych na dwa okresy: styczeń-luty oraz maj-czerwiec. W warunkach *in vivo* wykonano badania 24-godzinnego i 30-minutowego wpływu kisspeptyny na stężenie LH w krwi ryb poddanych działaniu GnRHa w obecności dopaminy lub po zablokowaniu jej aktywności. Ponadto, określono wpływ kisspeptyny na stężenie mRNA dla beta LH.

W warunkach *in vitro* określano wpływ różnych dawek kisspeptyny na wydzielanie LH z przysadek ryb traktowanych GnRHa i/lub inhibitorem układu dopaminergicznego. Dodatkowo, badano dawkozależny wpływ kisspeptyny na syntezę 17alfa20beta dihydroksyprogesteronu w jajnikach ryb traktowanych homogenatem przysadki karpia pobranej w okresie okołotarłowym.

Stężenie LH w krwi i mediach inkubacyjnych oraz progesteronu w medium określano przy użyciu gotowych testów ELISA. Stopień ekspresji genu kodującego mRNA dla beta LH oceniano przy pomocy metody PCR.

Należy podkreślić, że użyte metody -hodowli i inkubacji tkanek, wydzielania *in vitro*, immunoenzymatyczne oraz biologii molekularnej są nowoczesnymi, sprawdzonymi i odpowiednimi do oznaczeń badanych parametrów.

Uzyskane wyniki przedstawiono jako procentowe zmiany stężeń badanych parametrów w porównaniu do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej. Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę, że bardziej przydatne do dyskusji byłyby wyniki podawane w wartościach bezwzględnych.

Wyniki opisano w sposób jasny, logiczny, najpierw uzyskane w doświadczeniach *in vivo,* a następnie w eksperymentach *in vitro*.

Egzogenna kisspeptyna spowodowała w ciągu 24 godzin wzrost stężenia LH we krwi ryb traktowanych GnRH lub inhibitorem dopaminy, ale efekt ten

był uzależniony od stopnia aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej. Wyniki z tych doświadczeń wyraźnie potwierdzają zależność aktywności receptorów kisspeptyny w przysadce od obecności dopaminy w tej strukturze. Doktorant wnioskuje, że w okresie odbudowy gonad dopamina jest mniej aktywna (bądź jest jej mniej) i dlatego kisspeptyna może w pełni stymulować wydzielanie LH, co skutkuje wyższym stężeniem tej gonadotropiny w krwi. Jest to tłumaczenie poprawne, ale być może niepełne. Taki wynik jest wyzwaniem dla badacza, ponieważ jeśli nie ma danych o stężeniu dopaminy, to może warto byłoby się pokusić o inne wytłumaczenie. Być może krótki okres półtrwania tego fragmentu kisspetyny (wynoszący u ludzi mniej niż 5 min po podaniu dożylnym znacznie większej dawki peptydu), mógł być przyczyną szybkiej odpowiedzi przysadki, co nie zostało zauważone w czasie późniejszego pomiaru.

Pewną wskazówką dla takiego rozumowania jest wynik uzyskany w doświadczeniu tzw. krótkotrwałym, w którym egzogenna kisspeptyna już po dziesięciu minutach wywołała istotny wzrost stężenia LH w krwi ryb będących w okresie okołotarłowym. Ten spontaniczny wzrost stężenia LH w krwi po podaniu kisspeptyny nie został spotęgowany przez stymulację GnRH co jest niezwykle interesujące i może wskazywać, że to właśnie obecność kisspeptyny w tym okresie jest kluczowa dla bezpośredniego oddziaływania neurohormonu na przysadkę ryb. Doktorant dość krytycznie potraktował ten wynik wnioskując, że ten epizodyczny wzrost LH we krwi nie ma wpływu na odbudowę gonad. Być może, na odbudowę gonad nie ma bezpośredniego wpływu, ale niewątpliwie może szybko zainicjować kaskadę zdarzeń, których obecność jest kluczowa dla całego procesu remodelingu jajników.

Pan mgr inż. Gosiewski wykonał interesujące doświadczenie *in vitro* mające na celu określenie potencjalnego wpływu kisspeptyny na wydzielanie podstawowe progesteronu z fragmentów jajnika ryb w okresie okołotarłowym.

Wyniki wykazały wyraźną tendencję, chociaż nieistotną statystycznie na poziomie $P<0.05$, do wzrostu stopnia sekrecji tego steroidu z tkanki po działaniu najniższej koncentracji peptydu tj. 0.77 pmola, ale niespodziewanie nie zauważono żadnej odpowiedzi na 10-krotnie i stukrotnie wyższą dawkę kisspeptyny. Ponieważ Doktorant wykazał stymulujący wpływ hormonów przysadki karpia na wydzielanie progesteronu z jajnika karasia w okresie okołotarłowym tym samym potwierdził aktywność biologiczną tkanki w warunkach *in vitro*. Interesującym jest to, że kisspeptyna, niezależnie od dawki, całkowicie odwróciła ten stymulujący efekt homogenatu przysadki karpia. Na podstawie tych wyników można wnioskować, że kisspeptyna działając poprzez receptory w komórkach jajnika uaktywniła mechanizmy wewnątrzkomórkowe uniemożliwiające zapoczątkowanie odpowiedzi na hormony przysadki. Nasuwa się kolejne pytanie dotyczące sprecyzowania drogi działania kisspeptyny na komórki jajnika w warunkach *in vivo* –bezpośredniej i/lub pośredniej poprzez zmianę syntezy i sekrecji gonadotropin.

Dopełnieniem cyklu badań było doświadczenie mające na celu sprawdzenie wpływu kisspeptyny na ekspresję genu kodującego dla podjednostki beta LH w przysadce. Jako czynników sprawdzających aktywność komórek przysadki ryb użyto GnRH i pimozydu. Zastosowanie metody PCR do określenia wpływu kisspeptyny i pozostałych mediatorów na ekspresję genu kodującego dla podjednostki beta LH w przysadce mózgowej ryb będących w dwóch stadiach doświadczalnych nie było wystarczające do wykazania potencjalnych zmian w tym procesie. Doktorant stanowczo stwierdza, że jedyną dopuszczalną interpretacją uzyskanego wyniku może być zbyt długi czas jaki upłynął od podania testowanych czynników do momentu pobrania przysadek .Niewątpliwie, jeśli przyjmie się takie tłumaczenie, to wyniki te pomogą określić prawidłowy czas pobierania przysadek do badań molekularnych. Brak odpowiedzi na podanie kisspeptyny można byłoby także tłumaczyć zbyt małym

(lub nieistotnym) wpływem egzogennego hormonu. Jednak biorąc pod uwagę trzykrotnie silniejszą aktywność biologiczną tej sprzężonej formy kisspeptyny niż wolnej formy takie tłumaczenie jest mało prawdopodobne. Ponadto, wyniki badań opublikowanych w najnowszych pracach wyraźnie wskazują na konieczność starannego doboru formy i dawki podawanego specyfiku, a badania Pana mgr Gosiewskiego spełniają te warunki.

W dyskusji Pan mgr inż. Gosiewski przytacza wyniki innych autorów starając się tłumaczyć rozbieżności i uzasadniając podobieństwa w stężeniu badanych parametrów. Szczegółowo napisana dyskusja potwierdza wiedzę Doktoranta w zakresie fizjologii rozrodu ryb ze szczególnych uwzględnieniem regulacji syntezy i sekrecji gonadotropiny LH. Należy podkreślić także przydatność przejrzystych schematów ilustrujących potencjalny wpływ kisspeptyny na aktywność osi podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikową, ale moim zdaniem byłyby bardziej użyteczne gdyby umieszczono je w rozdziale poświęconym dyskusji, a nie we Wstępie.

Dyskusję zakończono czterema wnioskami, z których najbardziej istotnym jest pierwszy mówiący o interakcji kisspeptyny i dopaminy w obu badanych okresach aktywności rozrodczej ryb. Wnioski zostały sformułowane po krótkim podsumowaniu każdego eksperymentu.

Najważniejszymi elementami niniejszej rozprawy doktorskiej są przede wszystkim bardzo starannie zaplanowane i wykonane eksperymenty, logiczne interpretowanie uzyskanych, czasem kontrowersyjnych, wyników, a przede wszystkich nowe informacje o współdziałaniu neuromediatora kisspeptyny z układem dopaminowym na każdym poziomie osi podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowej u ryb. Należy podkreślić doskonałe wykorzystanie wszelkich zasad unikatowej szkoły naukowej stworzonej przez Panią Promotor, Prof. dr hab. Mirosławę Sokołowską-Mikołajczyk.

Podsumowując, uważam rozprawę doktorską za oryginalną, o uznanej wartości poznawczej, wnosząca interesujące wyniki do pełniejszego poznania fizjologii rozrodu ryb. Ponadto, wnioski wysnute przez Doktoranta mogą być pomocne dla zrozumienia regulacji aktywności osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej podczas dwóch okresów życia ryb, co może być także istotne z ekonomicznego punktu widzenia. Dlatego też pozytywnie oceniam wysiłek Doktoranta i Pani Promotor włożony w prowadzenie eksperymentów, analiz z użyciem nowoczesnej aparatury i napisanie rozprawy doktorskiej.

Uwagi, które umieściłam w recenzji wynikały z obowiązku recenzenta, nie umniejszają one mojej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej

Uważam, że oceniana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie nr 595 o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych oraz Tytule i Stopniach Naukowych w Dziedzinie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U.Nr 65 z dnia 14.04.2003r.) wraz z późniejszymi zmianami.

Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie z prośbą o dopuszczenie mgr inż. Grzegorza Gosiewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę interesującą naukową hipotezę badawczą, prawidłowo przeprowadzone doświadczenia oraz właściwą interpretację uzyskanych unikatowych wyników zwracam się do Wysokiej Rady o rozważenie nagrodzenia wyróżnieniem rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Gosiewskiego.

Krystyna Mozdziak

Kraków 1 września 2017 r.