



Ocena pracy doktorskiej lic. Alana Kani

pt.: „The involvement of the hypothalamic mechanism of relaxin-3 orexigenic action in the rat”.

Odkryta w 1926 r. relaksyna znana jest przede wszystkim ze swojego udziału w akcji porodowej. Neuropeptyd relaksynę-3 (RLN3) należąca do rodziny peptydów relaksynowych zidentyfikowano dopiero w 2001 r. Jej głównym miejscem występowania jest układ nerwowy, w tym przede wszystkim jądro niepewne. Natomiast biorąc pod uwagę funkcję relaksyny-3 wiąże się ją głównie z reakcjami poszukiwania pożywienia oraz alkoholu (w tym związanych ze stresem), pobudzeniem, czy uczeniem się i pamięcią (wg. Olucha-Bordonau i wsp., *CNS Neurosci Ther.* 2018;24:694). Niezwykle krótka historia relaksyny-3 wciąż wymaga dalszych badań, tym bardziej obecnie w dobie kiedy otyłość staje się jedną z głównych chorób cywilizacyjnych XXI wieku w bogatych społeczeństwach.

Biorąc powyższe pod uwagę tematyka przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej lic. Alan Kani, który podjął się szczegółowej, wielowątkowej oceny mechanizmów działania relaksyny-3 w podwzgórzu. jest zarówno aktualna jak i celowa. Rozprawa doktorska została wykonana pod opieką prof. dr hab. Grzegorza Hessa i dr hab. Anny Błasiak. Napisana w języku angielskim, licząca 138 ponumerowane strony, praca ma typowy układ. Rozpoczyna ją polsko- i angielskojęzyczne streszczenie, po którym następują abstrakt, spis skrótów, 14-stronnicowy wstęp, cel pracy (2 stron), materiał i metody (23 stron), opis wyników (38 stron), dyskusja (11 stron), wnioski oraz aż 275 pozycji piśmiennictwa. Logiczny układ pracy, poprawny styl, prawidłowe cytowanie i zestawienie literatury, a także przedstawienie i omówienie wyników wskazują na dobrze opanowaną przez Doktoranta umiejętność pracy naukowej. Porównując liczbę stron poświęconej każdej części pracę pragnę zwrócić uwagę na długie części opisujące wyniki i dyskusję, potwierdzające dużą liczbę wyników zamieszczonych w pracy i umiejętność ich przedyskutowania przez Doktoranta. Nowatorstwo przedstawionej mi do oceny pracy podkreśla ponadto fakt, że aż ok. 50% prawidłowo cytowanych publikacji została opublikowana po 2010 r., a ok. 30% pochodzi z lat 2000-2009. Doktorat zakończony jest szczegółowym zestawieniem dorobku naukowego Doktoranta.

Pierwsza część wstępu wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z relaksyną, zaczynając od przedstawienia rodziny peptydów relaksynowych, ich receptorów (RXFP), w tym receptora dla relaksyny 3 - RXFP3. Oczywiście więcej miejsca poświęcone jest relaksynie-3, jej rozmieszczeniu w ośrodkowym układzie nerwowym oraz udziałowi w kontrolowaniu przyjmowania pokarmu i stresie. W kolejnej części wstępu Doktorant zaznajamia czytelników z jądrem przykomorowym podwzgórza (PVN), podziane na neurony wielkokomórkowe (MNCs), stanowiące główne źródło oksytocyny (OXT) i wazopresyny (AVP) oraz drobnokomórkowe (PNCs), odpowiedzialne za syntezę i uwalnianie szeregu hormonów modulujących syntezę i uwalnianie hormonów przysadkowych. Możemy tutaj znaleźć nie tylko ogólne informacje dotyczące anatomii i funkcji tych neuronów, ale też związane z rozprawą doktorską wiadomości dotyczące elektrofizjologii neuronów MNCs i PNCs oraz różnic zależnych od płci. Ostatnia, trzecia część wstępu poświęcona jest mechanizmom odpowiedzialnym za kontrolowanie przyjmowania pokarmu, w tym logicznie ośrodkowej regulacji oraz udziałowi PVN, a także wpływowi stresu na przyjmowanie pokarmu i podstawom kompulsywnego objadania się (binge eating disorders; BED). Co ważne, każdy z podrozdziałów trzeciej części wstępu kończy się krótkim akapitem wskazującym na konieczność wykonania opisanych w niniejszej pracy doświadczeń. Tekst wstępu wzbogacony jest o 3 kolorowe ilustracje, obrazujące wewnątrzkomórkowy efekt pobudzenia receptorów RXFP3 przez RLX3, rozmieszczenie neuronów syntetyzujących RLX3 w mózgu i wzajemne powiązanie pomiędzy tymi ośrodkami, a także zdjęcie przedstawiające układ neurowydzielniczy MNCs, które, jak prawidłowo zaznacza Doktorant, zostało zamieszczone dzięki pozwoleniu wydawnictwa Elsevier.

Pragnę podkreślić, że wstęp bardzo dobrze wprowadza Czytelnika w zagadnienia stanowiące podstawę części badawczej i dyskusji. Niewątpliwie, niełatwo było napisać trzywątkowy wstęp (relaksyna3 – PVN – regulacja przyjmowania pokarmu). Jednak odczuwam trochę niedosytu jeżeli chodzi o opisanie znaczenia relaksyny-3 w regulacji przyjmowaniu pokarmu. Zabrakło mi też informacji o źródłach i funkcjach unerwienia GABA-ergicznego i glutaminianergicznego, tworzącego synapsy hamujące i pobudzające na badanych neuronach relaksynergicznych. Brak tej informacji utrudnia zrozumienie wyników i ich interpretację.

Wstęp rozprawy doktorskiej logicznie prowadzi do celu pracy i go wystarczająco uzasadnia. Było to scharakteryzowanie sygnalizacji RLN3/RXPF3 w PVN w kontroli pobierania pokarmu wraz z opisaniem rozmieszczenia i właściwości elektrofizjologicznych MNCs w PVN szczura oraz ich zależność od płci. W celu pracy oprócz wyliczenia powyższych zagadnień Doktorant wymienia najważniejsze metody niezbędne do realizacji celu, a także szczegółowe cele poszczególnych zagadnień.

Niewątpliwie na szczególną uwagę zasługuje część metodyczna, opis wyników i dyskusja. Ich dokładność, uzasadnianie poszczególnych kroków czy wyjaśnianie poszczególnych szczegółów świadczą o dużej dojrzałości naukowej doktoranta i jego bardzo dużym zaangażowaniu w realizację pracy.

Wstępna część rozdziału Materiały i Metody zawiera tak ważne stwierdzenia dotyczące pozwolenia Komisji Etycznej na przeprowadzenie zaplanowanych doświadczeń, charakterystykę zwierząt doświadczalnych (doświadczenia wykonano na szczurach samcach Wistar i samcach i samicach Sprague Dawley) oraz spis odczynników, czy opis metody określającą płć zwierząt. W doświadczeniach zastosowano szereg narzędzi farmakologicznych, w tym innych poza RLX-3 ligandów receptorów RXPF3 lub innych receptorów (w tym rodziny RXPF) lub kanałów jonowych. Potem następuje bardzo dokładny, wzbogacony 8 rycinami objaśniającymi szczegóły, czy protokoły poszczególnych doświadczeń, opis zasadniczych metod badawczych: (1) techniki patch-clamp w konfiguracji whole-cell; (2) single-cell reverse-transcription polymerase chain reaction (scRT-PCR; metoda jednokomórkowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją); (3) barwienie za pomocą immunofluorescencji i immunohistochemii, (4) wyznaczanie dróg nerwowych oraz (5) behawioralne, badające BED. Dwie ostatnie metody związane były m.in. z precyzyjną mikroinjecką związków do PVN z zastosowaniem aparatu stereotaktycznego. Z części metodycznej dowiedziałam się ponadto, że badania behawioralne wykonywane były we włoskim Uniwersytecie w Camerino. Pragnę podkreślić, że wszystkie wymienione powyżej techniki są bardzo nowoczesnymi metodami, pozwalającymi na uzyskanie dokładnych odpowiedzi na postawione pytanie i co ważne, umożliwiające potwierdzenie końcowych wniosków za pomocą różnych metod (np. elektrofizjologia i barwienie). Są to jednak trudne

metody i wymagające od osoby prowadzącej doświadczenia bardzo dużej precyzji i wiedzy.

Zarówno opis wyników jak i dyskusja podzielone są na 2 główne rozdziały: (1) działanie relaksyny-3/RXFP3 w PVN [w tym (a) modulowanie czynności elektrycznej neuronów PVN przez układ relaksyna 3/RXFP3; (b) anatomia unerwienia przez relaksynę-3 obszarów PVN; (c) udział receptorów RXFP3 w zachowaniu jedzenia kompulsywnego]; (2) charakterystyka neuronów MNCs w PVN [w tym (a) rozmieszczenie neuronów OXT i AVP w PVN oraz (b) elektrofizjologia domniemanych neuronów OXT i AVP MNCs w PVN].

Wyniki są przedstawione aż na 34 rycinach i zestawione w 7 tabelach, przy czym 10 rycin jest pojedynczych, a 9 podwójnych. Pozostałe 15 rycin zawiera od 3 do 5 składowych. Pragnę podkreślić, że wszystkie ryciny i tabele są bardzo dokładnie opisane. Każdorazowo wyjaśnione są wszystkie skróty, opracowanie statystyczne czy najważniejsze dane metodyczne. Tytuł większości rycin stanowi przy tym ogólny wniosek wyciągnięty na podstawie przedstawionych na rycinie wyników, co ułatwia zrozumienie całości. Dodatkowo na zakończeniu na zakończeniu każdej z dwóch części wyników umieszczono bardzo cenne przy tak dużej liczbie przedstawionych rezultatów podsumowanie.

Długa, jak już wspomniałam powyżej, ale sprawnie napisana, jak na olbrzymią liczbę zamieszczonych wyników, dyskusja wypunktowuje najważniejsze wyniki, przedyskutowuje je w oparciu o najnowszą literaturę i uzasadnia wyciągane wnioski. Niewątpliwie bardzo cenne, ponownie potwierdzające dużą dojrzałość naukową doktoranta są kończące poszczególne fragmenty dyskusji akapity przedstawiające ograniczenia (limitations) danych części pracy w tym takie jak m.in. konieczność potwierdzenia badań elektrofizjologicznych doświadczeniami, w których by mierzono czynność wydzielniczą neuronów, konieczność zastosowania w przyszłości szczurów zmodyfikowanych genetycznie, czy zwrócenie uwagi na możliwy brak specyficzności zastosowanych narzędzi farmakologicznych.

Dyskusja zakończona jest wnioskami nie wymienionymi w punktach jak w przypadku tradycyjnej pracy doktorskiej, ale w formie opisowej, jakie występują na zakończenie publikacji naukowych. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant stwierdza, że pobudzenie w PVN zlokalizowanych postsynaptycznie receptorów

RXFP3 połączonych z białkiem $G\alpha_{i/o}$ prowadzi do niezależnego od płci bezpośredniego hamującego wpływu na większość domniemanych MNCs, co może stanowić potencjalny mechanizm ośrodkowego działania oreksygenicznego RLN3. Natomiast zależna od receptorów RXFP3 hiperpolaryzacja w domniemanych MNCs następuje w wyniku pobudzenia prądu potasowego podobnego do prądu M. Przy czym gęstość włókien zawierających RLN3 (wyższa u samic niż u samców) jest niższa w PVN w porównaniu do obszaru przylegającego do tego jądra. Wspomniane powyżej różnice płciowe mogą stanowić podłoże anatomiczne w różnej podatności płci męskiej i żeńskiej na zaburzenia odżywiania. Ważną obserwacją jest wykazanie, że blokada RXFP3 w PVN zapobiega objawom kompulsywnego objadania się. Ciekawą obserwacją jest przy tym zaobserwowany w warunkach *in vitro* odwrotny, w porównaniu do agonisty, efekt antagonisty RXFP3, co wskazuje na ton endogennej pobudzenia tych receptorów.

Badania elektrofizjologiczne i anatomiczne MNCs w PVN wykazały więcej neuronów OXT- i AVP-pozytywnych u samców niż samic oraz u obu płci przewagę neuronów AVP. Natomiast badania elektrofizjologiczne wykazały szereg dotychczas nieopisanych różnic w elektrofizjologii domniemanych MNCs zależnych i niezależnych od płci. Jednocześnie Doktorant zwraca uwagę na potencjalne znaczenie swoich badań w przyszłości w tym zależnych od stresu zaburzeniach jedzenia oraz innych zaburzeniach psychiatrycznych jak autyzm, schizofrenia czy depresja.

Z czystej ciekawości mam 2 pytania do Doktoranta:

1. Jakie znaczenie może mieć toniczna aktywność receptorów RXFP3 i czy może się ona zmieniać w patofizjologii jakichś jednostek chorobowych, jak/których?
2. Jak chroniczne stosowanie agonistów RXFP3 może wpływać na elektrofizjologię i funkcję MNCs?

Pragnę podkreślić, że co prawda praca doktorska napisana jest w sposób tradycyjny, ale zamieszczone w niej wyniki zostały już opublikowane w 2 wymienionych poniżej publikacjach o bardzo wysokim jak na autora rozprawy doktorskiej Impact Factor odpowiednio 3,6 i 4,9, a kolejna praca została wysłana do

druku. Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich trzech publikacji, w tym jednej z 2017 r. powstałej w wyniku międzynarodowej współpracy, co niewątpliwie świadczy o Jego wiodącej roli, zaangażowaniu i kompetencji przy powstawaniu tych publikacji, a wysoka jakość uzyskanych wyników oraz ich nowatorstwo została już doceniona przez recenzentów prestiżowych czasopism.

- **Kania A**, Sambak P, Gugula A, Szlaga A, Soltys Z, **Błasiak T**, **Hess G**, Rajfur Z, Błasiak A. Electrophysiology and distribution of oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus: a study in male and female rats. *Brain Struct Funct.* 2019 Dec 9. doi: 10.1007/s00429-019-01989-4.
- **Kania A**, Gugula A, Grabowiecka A, de Ávila C, Błasiak T, Rajfur Z, Lewandowski MH, **Hess G**, Timofeeva E, Gundlach AL, **Błasiak A**. Inhibition of oxytocin and vasopressin neuron activity in rat hypothalamic paraventricular nucleus by relaxin-3-RXFP3 signalling. *J Physiol.* 2017 Jun 1;595:3425-3447.

Ponadto Doktorant jest 1-szym autorem napisanej po polsku pracy przeglądowej bezpośrednio związanej z tematyką niniejszej pracy doktorskiej:

- **Kania A**, Lewandowski MH, **Błasiak A**. Relaxin-3 and relaxin family peptide receptors--from structure to functions of a newly discovered mammalian brain system. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2014;68:851-64.

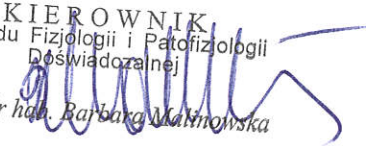
Wysoką jakość rozprawy doktorskiej lic. A. Kani potwierdza także zasadność wyboru Doktoranta na laureata prestiżowego stypendium Diamentowy Grant MNiSW czy przyznanie Mu grantu NCN Etiuda. Ponadto Doktorant realizował 4 granty przyznawane dla doktorantów, a finansowane przez Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UJ oraz był współwykonawcą grantu NCN Sonata przyznanego dla opiekuna niniejszego przewodu doktorskiego panią dr hab. A. Błasiak.

Podsumowując, całość rozprawy doktorskiej lic. Alana Kani oceniam bardzo wysoko. Otrzymane wyniki są nowatorskie, ciekawe, spójne, bardzo dobrze przedstawione oraz przedyskutowane i uzyskane w oparciu o zastosowanie precyzyjnych metod oraz opublikowane lub złożone do publikacji w prestiżowych czasopismach, przy czym Doktorant jest ich pierwszym autorem.

Rozprawa w pełni spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182; Poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455).

Dlatego też przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie lic Alana Kani do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a jednocześnie o **wyróżnienie** pracy doktorskiej.

Białystok, 15 grudnia 2019 r.

KIEROWNIK
Zakładu Fiziologii i Patofiziologii
Doświadczalnej

prof. dr hab. Barbara Malinowska