

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

Imię i nazwisko kandydata:Ewa Jaromin.....

Tytuł rozprawy doktorskiej:Neurophysiological mechanisms underlying increased performance of bank voles selected for high swim-induced aerobic metabolism

Promotor:Prof. dr hab. Paweł Koteja.....

Promotor pomocniczy/drugi promotor/kopromotor (jeżeli powołany):.....nie ma.....

Recenzent:Prof. dr hab. Krzysztof Turlejski.....

1. **Wartość naukowa rozprawy**

a. Oryginalność badań (25-200 słów):

Uważam pracę doktorską mgr Ewy Jaromin za w pełni oryginalną. Składa się na nią wstęp, trzy publikacje Doktorantki z lat 2016, 2018 i 2019 w czasopismach z IF, wraz z materiałami dodatkowymi do dwóch z tych prac, dyskusja całości i spis literatury. Do pracy załączone są oświadczenia wszystkich współautorów potwierdzające dominujący wkład doktorantki w publikacje wieloautorskie będące częścią rozprawy doktorskiej. Prace wykonane są na nornicy rudej, gatunku rzadko używanym w badaniach laboratoryjnych, a dotyczą udziału układów neuromodulacyjnych (monoaminowych i endokannabinoidowego) w motywacji i zdolności zwierząt do wykonywania maksymalnego wysiłku fizycznego, co było podstawą selekcji laboratoryjnej. W badaniach używano metody farmakologicznego blokowania receptorów wymienionych neuromodulatorów, jest to więc praca interdyscyplinarna, łącząca metody ekologii, selekcji hodowlanej na wybraną cechę, fizjologii i farmakologii. Jest to rzadko spotykana kombinacja metod, która użyta w badaniach na nornicy staje się kombinacją unikatową.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artkułów (25-200 słów):

Głównymi rozdziałami rozprawy są trzy prace naukowe opublikowane w czasopismach recenzowanych z Impact Factor. Dwie z tych prac są opublikowane w Current Zoology (IF=2.5, wyd. China Zoological Society), a jedna we Frontiers in Physiology (IF=3.2). Fakt wcześniejszej publikacji wyników badań w czasopismach z wysokim IF upewnia o ich co najmniej dobrej jakości naukowej. Wstęp pracy doktorskiej wprowadza czytelnika w powody podjęcia selekcji hodowanych nornic według kryterium maksymalnej wydolności tlenowej, metodykę selekcji i badań. Hipoteza badawcza o udziale układów emocji w osiąganiu „kryterium przeżycia”, wybranie odpowiedniego kryterium selekcji i gatunku zwierząt oraz jej prowadzenie przez 19-22 pokolenia doprowadziły do powstania unikatowego modelu, dobrze wykorzystanego w badaniach Autorki.

2. **Wartość merytoryczna rozprawy**

(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków) (25-200 słów):

Prace były prowadzone na unikatowym modelu nornicy rudej, selekcjonowanej przez 19-22 pokolenia na wysoki maksymalny poziom zużycia tlenu w czasie 18-minutowego testu pływania w

wodzie o temperaturze 38°C. Wysokie zużycie tlenu było miarą wysokiego BMRmax, a selekcja w tym kierunku miała naśladować procesy naturalnej selekcji środowiskowej, będącej podstawowym mechanizmem ewolucji. Autorka pracy doktorskiej postawiła pytanie o rolę i udział układów modulujących funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego, w szczególności układu emocji, w osiągnięciu maksymalnej zdolności do wysiłku, mierzonej maksymalnym poziomem produkcji dwutlenku węgla, a więc wysokim BMRmax. Badano wpływ podania nornicom linii wyjściowych i o wysokim poziomie BMRmax środków farmakologicznych blokujących wychwyt zwrotny neurotransmitterów modulujących (serotoniny, noradrenaliny i dopaminy). Środki te podnosiły ich poziom w ośrodkowym układzie nerwowym. Podawano też antagonistę receptora endokannabinoidowego CB1, wyłączającego jego naturalne funkcje sedatywne. Neuromodulatory te (na drodze zarówno synaptycznej, jak i parakrynowej) modulują aktywność układu emocji w mózgu, co w założeniu miało by wpływać na zdolność lub chęć podjęcia maksymalnego wysiłku i wydolność tlenową nornic w czasie testu wymuszonego pływania. Te założenia były bardzo interesującą strategią badawczą. Wykazały one, że jedynie zwiększenie poziomu noradrenaliny zmieniło (zwiększyło) BMRmax nornic. Te wyniki starannie przygotowanych badań były trudne do przewidzenia, a więc są bardzo wartościowe.

3. **Poprawność redakcyjna rozprawy**

(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Rozprawa zawiera wszystkie wymagane rozdziały w konwencjonalnym porządku. Jest ona napisana bardzo starannie w języku angielskim, z dwoma rozdziałami (streszczenie i podziękowania) w języku polskim. Jest ona kombinacją odautorskiego wprowadzenia w problematykę badań (8 stron), pełnych tekstów trzech publikacji w czasopismach recenzowanych, włączonych do rozprawy jako jej rozdziały, dyskusji ogólnej (7 stron) i spisu literatury cytowanej we wstępie i dyskusji (79 pozycji). Publikacje w międzynarodowych czasopismach były oczywiście wcześniej oceniane pod kątem poprawności redakcyjnej. Znalazłem tylko kilka błędów typograficznych (w spisie literatury), a więc tekst obecnie dodany jest napisany starannie i w dobrym stylu.

4. **Uwagi krytyczne**

Nie mam większych uwag krytycznych dotyczących przedstawionej mi pracy doktorskiej mgr Ewy Jaromin. Drobne uwagi przedstawię na końcu tego punktu. To co piszę poniżej jest formą dyskusji naukowej. Zaznaczę też, że o ile mam własne doświadczenie w zakresie neurofizjologii i zachowania zwierząt, to na przykład ich metabolizmu nigdy nie badałem. Chciałbym jednak – w ramach dyskusji - przedstawić kilka myśli i pytań, które nasunęły mi się przy lekturze pracy doktorskiej mgr Jaromin. Na niektóre z tych pytań nie znajdowałem odpowiedzi w tekście dysertacji.

Kiedy przeglądając literaturę usiłowałem się dowiedzieć, czy ktoś jeszcze poszukiwał odpowiedzi na podobne pytania, często stwierdzałem że to właśnie zespół badawczy w którym pracuje Doktorantka prowadził takie badania i że są one w pracy doktorskiej zacytowane, ale bardzo zdawkowo, a zasługiwałyby na szerszą dyskusję, w kontekście wyników Autorki. Moje najważniejsze pytania dotyczyły interpretacji wyników w teście pływania, zmian w termogenezie niezależnej od wysiłku fizycznego wywołanych selekcją i tego, jakie byłyby wyniki testowania tych zwierząt w otwartym polu. Autorzy mierzyli poziom metabolizmu w teście pływania w naczyniu, w którym temperatura wody wynosiła 38oC (publikacja Nr 2 pracy doktorskiej). Uzasadnienie zastosowania tak wysokiej temperatury wody znalazłem w innej publikacji z tej pracowni: temperatura wody 36-38oC jest dla nornic pływających ze zwilżonym futerkiem (detergent) temperaturą termoneutralną - w tej temperaturze nornice nie wychładzają się, ani nie przegrzewają, w związku z czym ich brązowa tkanka tłuszczowa (BAT) nie uruchamia termogenezy bezwysiłkowej, a wydzielany dwutlenek węgla jest

głównie skutkiem metabolizmu pracujących mięśni. Głównie, gdyż jednak stale istnieją wydatki energetyczne niezależne od wysiłku, n.p. mózg stale zużywa pewien procent pobieranego tlenu (u człowieka około 20%) , a jego wzmożona praca zwiększa ogólne zapotrzebowanie na tlen bardzo niewiele. Ośrodkowy układ nerwowy powoduje więc stałe wydatki energetyczne zależne od masy mózgu. W jednej z prac zespołu Prof. Kotei znalazłem wzmiankę, że nornice linii wyselekcjonowanej na wysoki poziom aktywności miały większe mózgi. Doktorantka nie odniosła się do tego faktu w dyskusji, a szkoda.

Ponadto, jest pewien problem z testowaniem innych gatunków gryzoni laboratoryjnych (szczury, myszy), a także oposów, w apartach, w których muszą pływać: wysoka temperatura wody redukuje ich chęć pływania, a niska sprawia, że pływają bez celu, zapewne by się ogrzać. Gdy temperatura wody jest zbyt wysoka, wzrasta czas „floatingu” (unoszenia się na powierzchni bez ruchu), z którym doktorantka też miała problem. Zwierzęta wydają się zadowolone z kąpieli i specjalnie się nie wysilają, bo nie mają do tego motywacji – ani im nie zimno, ani nie mogą uciec. Doktorantka też zauważyła, że niektóre jej nornice ledwie wystawiają nosy z wody i momentami przestają się poruszać. Gdy woda jest zimniejsza, szczury i myszy aktywnie poszukują miejsca, na którym mogłyby przysiąść, utrzymując większość ciała nad powierzchnią wody, a gdy woda jest jeszcze zimniejsza (od około 20oC), stale szybko krążą po powierzchni wody wokół brzegu naczynia, poszukując wyjścia. Testując pamięć przestrzenną myszy w basenie Morrisa (średnica 100 cm), w którym pływając muszą znaleźć platformę ukrytą pod powierzchnią wody, zazwyczaj utrzymuje się wodę w temperaturze 22-24oC., bo gdy jest cieplejsza zwierzęta przestają się wysilać i „floatują”. Także w teście Porsolta, gdy myszy pływają w cylindrze o średnicy podobnej do tej, jaką miał aparat Doktorantki, temperatura wody jest znacznie niższa (zazwyczaj 24oC). W teście tym badany jest czas do osiągnięcia stanu braku nadziei na wyjście z naczynia, co skutkuje zaprzestaniem wysiłków i tonięciem. W takich warunkach testuje się leki przeciwdepresyjne, z których wiele jest inhibitorami wychwytu serotoniny i podnosi jej poziom w mózgu. Leki te znacznie wydłużają czas „walki o życie”, a jak świadczy wydłużenie tego czasu po zwiększeniu poziomu serotoniny, powodem zaniechania wysiłków jest popadnięcie w stan beznadziei, depresję, a nie wyczerpanie fizyczne czy przemarznięcie. Podobny związek, testowany przez Doktorantkę nie wpłynął na maksymalny poziom metabolizmu wysiłkowego nornic. Moje pytania w związku z tym:

1. Czy na pewno mechanizmy serotonergiczne nie zostały zmienione przez selekcję zwierząt? Jak Autorzy sami zauważyli, maksymalny metabolizm nornic w wodzie o temperaturze 38oC jest niższy, niż podczas wymuszonego biegu, a więc nie jest to ich maksymalny metabolizm wysiłkowy. Może jednak w tej temperaturze wody duży wysiłek zwierząt powoduje ich przegrzewanie się? Nie wiem, jaka jest temperatura ciała nornic. U myszy jest to 36.5oC. Czy nie należało wobec tego spróbować testowania zwierząt w nieco chłodniejszej wodzie, nawet ryzykując uruchomienie termogenezy w BAT?

2. Jest wiele typów receptorów serotonergicznych. Niektóre z nich mają przeciwstawne działanie i zależnie od tego ekspresja którego receptora ma miejsce i zmienia się w strukturze kluczowej dla danej funkcji, taka sama zmiana poziomu serotoniny może powodować zupełnie inne skutki. Autorzy nie badali, czy ekspresja receptorów neuromodulatorów zmienia się pod wpływem selekcji na maksymalny poziom metabolizmu, więc pozostaje jeszcze spory margines niewiedzy.

3. Jedynie środek, który podnosił poziom noradrenaliny zwiększył wydatek energetyczny podczas pływania. Noradrenalina jest pierwszą substancją wydzielaną do krwi podczas stresu. W większości jej pochodzi z układu nerwowego, mniejsze jej ilości wydziela rdzeń nadnerczy. Odwrotnie jest z adrenaliną. Noradrenalina wywołuje stan koncentracji, alertu, mobilizacji. Czy nie dlatego na bieżni, w sytuacji konieczności uniknięcia „kopnięcia” prądem, metabolizm był wyższy? Być może woda o temperaturze 38oC była jednak zbyt ciepła?

Brak zmian w metabolizmie spoczynkowym (BMR) został opisany w pracy Sadowska et al. 2015. Publikacja ta znajduje się w spisie literatury pracy doktorskiej, została zacytowana w tekście, ale nie była dyskutowana przez Doktorantkę. Także test otwartego pola był wcześniej stosowany w badaniach tych nornic (Mati et al. 2018). Ta praca ta jest w spisie cytowanych publikacji rozprawy doktorskiej, ale nie została nigdzie zacytowana.

Nigdzie nie omówiono udziału tarczycy, tyroksyny i jej receptora w kontroli poziomu metabolizmu. W Pubmed natychmiast pojawiają się publikacje o niższej temperaturze ciała (a więc i BMR) myszy z mutacjami tego receptora. Uwaga ta nie jest zarzutem do przeprowadzonych badań, w świetle tego, że spoczynkowy BMR się nie zmienił, ale czy na pewno nie ma żadnych zmian w tym układzie, które by ograniczały BMRmax? Tylko badania molekularne mogą na to pytanie odpowiedzieć.

Od strony formalnej praca jest prawie bez zarzutu. Najwięcej uchybień znalazłem w spisie literatury: niewielka liczba błędów typograficznych, praca widniejąca w spisie nie zacytowana w tekście, praca z roku 2019, która w czasopiśmie ma już numery stron, ale jest cytowana w formie po jej akceptacji (bez tych numerów). Są to jednak drobne błędy, które notuję z obowiązku recenzenta.

5. **Ocena końcowa** (uzasadnienie 25-200 słów):

Unikatowy model badań i ciekawy problem, dobrze postawione (tzn. falsyfikowalne) hipotezy badawcze, właściwa (mimo pewnych znaków zapytania) metodyka badań i analiza wyników, ciekawe wyniki już opublikowane w czasopismach z dobrym IF, co zapewnia ich wpływ na przyszłe badania naukowe, ciekawa dyskusja końcowa i staranna redakcja całości skłaniają mnie do uznania, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest na bardzo wysokim poziomie. Oceniam ją na stopień bardzo dobry (5).

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Ewy Jaromin spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Ewy Jaromin do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK/NIE

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.
Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

TAK/NIE

Wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Ewy Jaromin. Fakt wcześniejszego opublikowania badań będących podstawą pracy doktorskiej w trzech pracach naukowych, wszystkie w czasopismach z dobrym IF, jest wystarczającym powodem postulowania takiego wyróżnienia. Ciekawe hipotezy badawcze, unikatowy model badań, złożone techniki badawcze oraz staranne przeprowadzenie badań i analiza wyników złożyły się na ten sukces, a ciekawy wstęp i dyskusja ogólna potwierdzają dużą klasę naukową doktorantki. Dlatego też, uważam jej pracę doktorską za godną wyróżnienia.

02 października 2019

.....
data sporządzenia recenzji


Krzysztof Turlejski

.....
podpis recenzenta