Prof. dr hab. inż. Anna Hrabia
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków
Tel.: 662-40-47; anna.hrabia@urk.edu.pl
Adres do korespondencji:
Al. Mickiewicza 21
31-120 Kraków

Kraków, 20.07.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Katarzyny Kisielewskiej

pod tytułem

"Wpływ chemeryny na funkcje przysadki świni domowej (*Sus scrofa domestica L.*) w cyklu rujowym i wczesnej ciąży"

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Tadeusza Kamińskiego dotyczy aktualnego problemu naukowego jakim jest poznanie zaangażowania systemu chemerynowego w funkcjonowanie przysadki świni domowej w cyklu rujowym i wczesnej ciąży. Badania wpisują się w tematykę zainteresowań naukowych Zespołu badawczego, w którym Doktorantka realizowała pracę. Badania wykonano w ramach projektu badawczego nr 2015/17/B/NZ9/03595 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Rozprawa składa się z dwóch części. Pierwsza (34 strony) w języku polskim, stanowi syntetyczny opis dokonań Doktorantki i obejmuje streszczenia w języku polskim i angielskim, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp, cel i zakres badań, materiał i metody, wyniki, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię (44 pozycje). Druga część to reprodukcje dwóch publikacji składających się na rozprawę doktorską i oświadczenia współautorów.

We Wstępie Autorka jasno wprowadza czytelnika w temat, bardzo krótko omawiając funkcję endokrynną tkanki tłuszczowej oraz charakteryzuje chemerynę, jej receptory oraz rolę. Następnie dokonuje przeglądu dotychczasowej wiedzy na temat udziału chemeryny w regulacji procesów rozrodczych. Te informacje dały podstawę do sprecyzowania hipotez badawczych zakładających, że (**1**) "*w komórkach przysadki świni ma miejsce ekspresja chemeryny i jej receptorów, przy czym poziom ekspresji odpowiednich transkryptów i białek zależy od statusu hormonalnego świni związanego z fazą cyklu rujowego i okresem wczesnej ciąży"*, a także (**2**) "*chemeryna poprzez aktywację/inhibicję szlaków Akt, MAPK/Erk 1/2 i AMPK wpływa na regulację funkcji sekrecyjnych komórek przysadki świni*". W celu weryfikacji hipotez Autorka zaplanowała:

(**1**) *ocenę poziomu ekspresji genów oraz ilości białek chemeryny i jej receptorów (CMKLR1, GPR1 i CCRL2) w komórkach przedniego i tylnego płata przysadki w czterech fazach cyklu rujowego (2.-3., 10.-12., 14.-16., 17.-19. dzień cyklu) oraz czterech fazach wczesnej ciąży (10.-11., 12.-13., 15.-16., 27.-28. dzień ciąży) metodami real-time PCR i Western blot;*
(**2**) *określenie komórkowej lokalizacji białek chemeryny i jej receptorów w cyklu rujowym (10.-12. dzień cyklu) i wczesnej ciąży (15.-16. dzień ciąży) metodą immunofluorescencji;*
(**3**) *ocenę wpływu chemeryny, w różnych stężeniach, na podstawową i indukowaną GnRH i/lub insuliną sekrecję LH i FSH przez komórki przedniego płata przysadki w badanych fazach cyklu rujowego metodą ELISA;*
(**4**) *zbadanie wpływu chemeryny na aktywację/inhibicję szlaków sygnałowych Akt, MAPK/Erk 1/2 i AMPK w komórkach przedniego płata przysadki w 10.-12. dniu cyklu rujowego metodą Western blot.*

Założenia pracy zostały zrealizowane przez Autorkę z sukcesem. W badaniach *in vivo* i *in vitro* zastosowano pracochłonne metody badawcze w tym immunoenzymatyczną (ELISA) do oznaczenia stężenia LH i FSH w medium hodowlanym, PCR w czasie rzeczywistym i Western blot do oznaczania ekspresji genów na poziomie odpowiednio mRNA i białka, immunofluorescencyjną do określenia lokalizacji chemeryny i jej trzech receptorów oraz siedmiu innych białek, a także izolację a następnie hodowlę komórek przedniego płata przysadki. Doświadczenia zostały bardzo starannie zaplanowane i wykonane, a metodyka badań została dość dokładnie opisana w rozdziale Materiały i Metody. W kolejnym rozdziale, Autorka przedstawiła najważniejsze wyniki badań. Generalnie, rozdział napisany jest prawidłowo, choć nie uniknięto kilku niewłaściwych sformułowań jak na przykład "zawartość mRNA" czy "zawartość transkryptu". Z opisu nie wynika, aby ilość transkryptu czy mRNA była przeliczana na całą przysadkę. Dalej, chemeryna, GnRH i insulina były dodawane do medium inkubacyjnego, a nie podawane zwierzętom na co wskazuje opis wyników, gdzie użyto określeń: "podanie chemeryny stymulowało", "od podania czynnika", "podanie adipokiny". Należy podkreślić, że uzyskane wyniki są nowatorskie, mają istotną wartość poznawczą i znacznie poszerzają dotychczasową wiedzę na temat funkcjonowania systemu chemerynowego w przysadce i udziału chemeryny w kontroli procesów rozrodczych u samic świni. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto 6 wniosków, które trafnie odpowiadają na postawione w pracy hipotezy.

Kolejny rozdział to reprodukcje dwóch publikacji składających się na rozprawę doktorską. Wchodzące w skład rozprawy oryginalne prace naukowe zostały opublikowane w roku 2020 w prestiżowych czasopismach, tj. Animal Reproduction Science i Theriogenology. Ich sumaryczna liczba punktów według listy MEiN z grudnia 2021 r. wynosi 280, a łączny IF_{2020} = 4,885. Cytowania tych prac można już zaleźć w literaturze światowej, co świadczy o ich wysokim poziomie naukowym. Wszystkie prace są dziewięcio-autorskie, a Pani mgr

Katarzyna Kisielewska jest w nich pierwszym autorem. Nie podano procentowego udziału Doktorantki w realizacji każdej z publikacji, ale jak wskazują stosowne oświadczenia Jej udział w przygotowaniu publikacji był wiodący. Uczestniczyła Ona w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, pobieraniu materiału, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu i udzielaniu odpowiedzi na pytania recenzentów podczas procesu publikacyjnego.

Ze względu na fakt, że przedstawione do recenzji prace były już oceniane przez kilku kompetentnych recenzentów i redaktorów czasopism oceniam je w aspekcie poznawczym i jako wkład w rozwój dyscypliny naukowej.

W pierwszej publikacji udokumentowano obecność transkryptu i białka chemeryny w przednim i tylnym płacie przysadki mózgowej świni oraz zmiany w ich ilości podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży. Ponadto, białko chemeryny zlokalizowano w komórkach gonadotropowych, tyreotropowych i somatotropowych przysadki. W warunkach *in* vitro wykazano, że chemeryna zmienia podstawową i regulowaną GnRH- i/lub insuliną sekrecję LH i FSH przez komórki przedniego płata przysadki w cyklu rujowym. Uzyskane wyniki wskazują, że chemeryna może być produkowana lokalnie w przysadce, a przez kontrolę uwalniania gonadotropin z komórek przysadki może wpływać na funkcje rozrodcze.

W drugiej pracy wykazano po raz pierwszy obecność mRNA i białka trzech rodzajów receptorów dla chemeryny (CMKLR1, GPR1, CCRL2) w przednim i tylnym płacie przysadki świni co wskazuje na działanie chemeryny w tym gruczole. Obserwowano zmiany w ekspresji receptorów dla chemeryny w cyklu rujowym i wczesnej ciąży, co może by związane ze statusem endokrynnym świni. Ponadto stwierdzono ko-lokalizację receptora CMKLR1 z LH, FSH i TSH, a receptora CCRL2 także z GH. Ważnym odkryciem było również wykazanie *in vitro*, że chemeryna aktywuje/hamuje szlaki sygnałowe Akt, MAPK/Erk 1/2 i AMPK, które zaangażowane są w

sekrecję gonadotropin. Zatem chemeryna może być zaangażowana w modulację funkcji rozrodczych przez bezpośrednie oddziaływanie w przysadce i może być elementem generalnego systemu hormonalnego łączącego status metaboliczny z rozrodem.

Powyższe publikacje są spójne tematycznie i stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego wyjaśnienia obecności i roli systemu chemerynowego w przysadce świni. Po lekturze publikacji składających się na rozprawę doktorską recenzentowi nasunęło się kilka pytań. Proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas obrony pracy doktorskiej.

1. Proszę wyjaśnić dlaczego ograniczono się do określenia wpływu chemeryny na sekrecję LH i FSH przez komórki przysadki, a nie badano wpływu tej adipokiny na sekrecję TSH i GH, choć w komórkach tyreotropowych i somatotropowych wykryto obecność chemeryny i jej receptorów.
2. Czy brano pod uwagę wykonanie analizy ko-lokalizacji chemeryny i jej receptorów z prolaktyną, a następnie określenie wpływu chemeryny na sekrecję prolaktyny?
3. Jaką potencjalną rolę może pełnić chemeryna w tylnym płacie przysadki mózgowej? Czy planowane są kolejne badania aby uzupełnić tę wiedzę.
4. Proszę wyjaśnić jakie znaczenie praktyczne mogą mieć uzyskane wyniki? W jakich aspektach mogą być wykorzystane?

Podsumowując, przedstawioną do oceny rozprawę oceniam bardzo wysoko. Jest ona obszernym opracowaniem zawierającym oryginalne wyniki co potwierdza ich opublikowanie w bardzo dobrych czasopismach naukowych, o wysokim współczynniku wpływu (IF). Autorka wykazała duże predyspozycje i umiejętność wykorzystywania różnorodnych technik badawczych, znajomość przedmiotowego piśmiennictwa, opracowania i prezentacji wyników,

poprawnego wnioskowania i przygotowywania publikacji do druku co predysponuje Ją do dalszej pracy naukowej.

Z pełnym przekonaniem uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska i indywidualny wkład Kandydatki w powstanie tej pracy spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.) i przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Kisielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość merytoryczną pracy, oryginalność uzyskanych wyników i opublikowanie ich w czasopismach o światowym zasięgu, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej.

