Kraków, 26 lipca 2023 r.

dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ
Zakład Endokrynologii
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr Marleny Gudelskiej
pt. "*Rola chemeryny w macicy świni domowej (Sus scrofa domestica L.) w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży*" wykonanej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem promotor prof. dr hab. Niny Smolińskiej oraz promotora pomocniczego dr. Kamila Dobrzynia

Tkanka tłuszczowa jest największym gruczołem endokrynnym w organizmie. Produkowane przez nią czynniki tj. lipidy, cytokiny, hormony, egzosomalne mikroRNA czy adipokiny, wykazują wszechstronne działanie na różne narządy i tkanki, w tym na układ rozrodczy żeński. Adipokiny - a wśród nich chemeryna, stanowiąca przedmiot niniejszych badań - cieszą się w ostatnich latach stale rosnącym zainteresowaniem badaczy i naukowców na całym świecie, co znajduje swoje uzasadnienie w postępującej globalnej epidemii nadwagi i otyłości. Prowadzi ona przede wszystkim do zaburzeń metabolicznych, ale również może wpływać na płodność kobiet, wskazując tym samym na istotny związek pomiędzy statusem energetycznym a prawidłowym funkcjonowaniem układu rozrodczego żeńskiego. Przedłożona do oceny praca doktorska, dotycząca określenia roli chemeryny w macicy podczas cyklu płciowego i wczesnej ciąży na modelu świni domowej, znakomicie wpisuje się w ten aktualny i ważny nurt badawczy. O ile dotychczasowe badania zespołu prof. Niny Smolińskiej wykazały już wpływ chemeryny na oś podwzgórze-przysadka-jajnik u świni, to jej działanie w macicy w różnych stanach fizjologicznych wciąż wymaga dalszych badań i potwierdzenia. Dlatego, w mojej opinii tematyka podjęta przez Doktorantkę jest oryginalna, a praca doktorska istotnie poszerza wiedzę z zakresu endokrynologii rozrodu samicy.

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel./fax: +48 12 664 50 98

OCENA FORMALNA ROZPRAWY

Praca doktorska Pani Marleny Gudelskiej oparta jest na wynikach badań podstawowych, które wpisują się w tematykę nauk biologicznych, przedstawionych jako spójny cykl trzech oryginalnych prac naukowych opublikowanych w latach 2020-2023 w recenzowanych czasopismach z bazy Journal Citation Reports (*Animal*, *Theriogenology*, *International Journal of Molecular Sciences*) o zasięgu międzynarodowym. Do publikacji dołączono także obszerne *Supplementary data*. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, *imapct factor*) czasopism wynosi 12.371, a suma punktów MEiN to 480. Publikacje są opracowaniami zbiorowymi liczącymi 7-8 współautorów. W każdym z artykułów Doktorantka jest pierwszym autorem, a wiodący udział w ich powstaniu potwierdzają dołączone oświadczenia współautorów. Wynika z nich, że Pani Marlena Gudelska brała udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, analizie i zarządzaniu danymi, pozyskiwaniu materiału, wykonywaniu analiz laboratoryjnych, opracowywaniu i walidacji wyników, opracowywaniu graficznym uzyskanych wyników, przygotowywaniu pierwotnej wersji manuskryptu i udzielaniu odpowiedzi na recenzje.

Do publikacji oraz oświadczeń współautorów dołączono opracowanie w języku polskim o typowym układzie. Na 41 stronach znajdują się kolejno streszczenia w języku polskim i angielskim, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp wprowadzający umiejętnie w tematykę badań i uzasadniający ich podjęcie, hipoteza, cel oraz zadania badawcze przedstawione również w formie czytelnego schematu, materiał i metody badawcze, wyniki, podsumowanie i wnioski oraz bibliografia w liczbie 50 pozycji. Pod względem edytorskim i językowym ta część pracy została przygotowana bardzo starannie i przejrzyście, co sprawiało, że czytało się ją z wielką przyjemnością i zainteresowaniem. Uważam, że rozprawa spełnia wszystkie wymagania formalne stawiane pracom doktorskim w rozumieniu zapisu art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

OCENA WARTOŚCI MERYTORYCZNEJ ROZPRAWY

Pierwsza praca wchodząca w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej opisuje szczegółowo ekspresję systemu chemerynowego (chemeryny i jej receptorów CMKLR1, GPR1 i CCRL2) na poziomie transkryptu i białka w błonie śluzowej i mięśniowej macicy świni podczas cyklu rujowego (dni 2-3, 10-12, 14-16, i 17-19) i w okresie wczesnej ciąży (dni 10-11, 12-13, 15-16, 27-28 i 30-32), a także w zarodkach (dni 15-16, 27-28 i

30-32) i trofoblastach (dni 27-28 i 30-32). Ponadto zbadano koncentrację chemeryny w płynie macicznym. W kolejnej publikacji Doktorantka przedstawiła wyniki badań dotyczących wpływu estradiolu i progesteronu na ekspresję genu i białka chemeryny oraz receptorów CMKLR1, GPR1 i CCRL2 w błonie śluzowej macicy świni podczas wczesnej ciąży oraz w fazie środkowolutealnej cyklu rujowego (10-11 dzień cyklu). Natomiast w trzeciej pracy zbadała wpływu chemeryny na sekrecję estradiolu i progesteronu oraz ekspresję białek szlaku steroidogenezy w błonie śluzowej macicy świni podczas wczesnej ciąży oraz w fazie środkowolutealnej cyklu rujowego (10-11 dzień cyklu), a także przedstawiła wpływ chemeryny na fosforylację białek ścieżek sygnałowych ERK1/2 oraz Akt w błonie śluzowej macicy z fazy środkowolutealnej. Należy podkreślić, że wszystkie zadania badawcze zostały zrealizowane w sposób konsekwentny, a wykorzystane metody badawcze są adekwatne do postawionych celów. Doktorantka wykazała się znajomością wielu technik laboratoryjnych, zaczynając od *inkubacji in vitro skrawków endometrium*, poprzez analizy immunoenzymatycznego i radiommunologicznego oznaczenia stężenia hormonów, do analizy Western blot oraz reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Należy podkreślić także zakres wykonanej pracy, który obejmował materiał badawczy z różnych dni cyklu i ciąży.

Do najważniejszych osiągnięć pracy Pani mgr Marleny Gudelskiej zaliczam:

1. Wykazanie zależnej od dnia cyklu i ciąży ekspresji genów i białek dla *chemeryny oraz jej receptorów CMKLR1, GPR1 i CCRL2 w błonie śluzowej* i mięśniowej macicy oraz trofoblastach i zarodkach, a także obecności chemeryny w płynie macicznym, co może wskazywać na lokalną syntezę i działanie tej adipokiny w macicy świni.

2. Wykazanie zależnego od dawki wpływu estradiolu i progesteronu *in vitro* na sekrecję chemeryny i ekspresję systemu chemerynowego w błonie śluzowej macicy w okresie wczesnej ciąży, co może świadczyć o regulatorowym wpływie środowiska hormonalnego na system chemerynowy w macicy świni.

3. Stwierdzenie wpływu chemeryny *in vitro* na sekrecję estradiolu *i progesteronu przez błonę śluzową macicy świni oraz ekspresję białek szlaku* steroidogenezy za pośrednictwem ścieżek sygnałowych ERK1/2 oraz Akt.

Przedłożone prace stanowią logiczny i spójny układ, są napisane zrozumiale, z jasno postawionymi celami, szczegółowym opisem metod analitycznych oraz wyników, a także prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. Wartość poznawczą wyników otrzymanych przez Doktorantkę oceniam

wysoko, potwierdzając tym samym Jej zdolność do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

UWAGI I KOMENTARZE

Lektura powyższych publikacji była dla mnie satysfakcjonująca i nie znalazłam w nich elementów problematycznych. W przypadku pracy doktorskiej składającej się z cyklu publikacji, recenzent ma ułatwione zadanie, gdyż każdy z artykułów przeszedł wnikliwą ocenę, która zaowocowała ich publikacją. Mam jednak kilka komentarzy i pytań, odnośnie zarówno cyklu publikacji, jak i opracowania polskojęzycznego, które stanowią jedynie przyczynek do dyskusji naukowej.

1. Hipoteza badawcza przedstawiona przez Doktorantkę na stronie 13 opracowania polskojęzycznego zakłada udział chemeryny w regulacji funkcjonowania macicy świni domowej w czasie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży. Ze względu, iż w pracy zbadano wpływ chemeryny jedynie na *funkcję steroidogenną macicy, w mojej opinii hipoteza badawcza powinna być* zawężona do tego procesu.

2. W publikacji nr 1 Doktorantka przedstawiła profil ekspresji genów i białek dla chemeryny oraz jej receptorów w macicy świni podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży. Bardzo dobrym uzupełnieniem zaprezentowanych wyników byłoby wykazanie komórkowej lokalizacji chemeryny i jej receptorów metodą immunohistochemiczną/immunofluorescencyjną. Czy Doktorantka może wskazać, które dokładnie komórki macicy produkują chemerynę, a które na nią odpowiadają?

3. Dlaczego w publikacji nr 1 nie pokazano reprezentatywnych blotów dla analizowanych białek, a jedynie wartości liczbowe dla względnej ich zawartości?

4. W publikacji nr 1 Doktorantka przedstawiła koncentrację chemeryny *w płynie macicznym w czasie cyklu rujowego oraz w ciąży, wskazując jej* możliwe zaangażowanie podczas matczynego rozpoznania ciąży oraz implantacji. Interesujące byłoby porównanie poziomu chemeryny w płynie macicznym oraz we krwi (*Smolinska i wsp. Int J Mol Sci. 2019;20(16):3887*), co pokazałoby zależność pomiędzy tymi płynami ustrojowymi. Proszę Doktorantkę o takie porównanie oraz próbę wyjaśnienia zaobserwowanych zmian.

5. W całym opracowaniu polskojęzycznym pojawia się sformułowanie „enzymy steroidogeniczne". W mojej opinii powinno ono zostać zmienione na „enzymy steroidogenne" lub „enzymy steroidogenezy". Ponadto w opisie

metod badawczych Doktorantka używa określenia „hodowla *in vitro*", co nie odzwierciedla prowadzonych przez nią eksperymentów, będących *de facto* inkubacjami *in vitro* skrawków/eksplantów endometrium.

6. Czy na podstawie uzyskanych wyników można wg. Doktorantki wskazać kierunek (pozytywny/negatywny) działania chemeryny w macicy świni? Zakładając lokalną produkcję tej adipokiny w macicy, w jaki sposób można uwzględnić w tym efekcie działanie chemeryny produkowanej przez tkankę tłuszczową?

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Marleny Gudelskiej pt. " *Rola chemeryny w macicy świni domowej (Sus scrofa domestica L.) w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży*" stanowi wartościowe i oryginalne dzieło naukowe o znaczącym wkładzie w poszerzenie dotychczasowego stanu wiedzy z zakresu endokrynologii rozrodu samicy. Uzyskane wyniki są nowatorskie i mogą przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów związanych zachodzących w okresie okołoimplantacyjnym u świni jako zwierzęcia gospodarskiego. Uwagi zawarte w niniejszej recenzji nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Przedłożona dysertacja wnosi istotne elementy do nauki i spełnia wszystkie wymagania określone w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U.2023.742 ze zm.) stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym **zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Marleny Gudelskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres wykonanych analiz, ich kompleksowość oraz oryginalną tematykę badawczą, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie dysertacji stosowną nagrodą.

Z wyrazami szacunku,

Grzesiak

dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ