INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI PAN
W OLSZTYNIE

ul.Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, tel.: (+48 89) 523-46-86; 524-03-13
Fax (+48 89) 524-01-24; e-mail: instytut@pan.olsztyn.pl; www.pan.olsztyn.pl

Dr hab. Agnieszka Wacławik, prof. PAN
Zakład Mechanizmów Działania Hormonów
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk
Ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn

Olsztyn, 31.07.2023

Recenzja pracy doktorskiej **mgr Marleny Gudelskiej**

pt. „Rola chemeryny w macicy świni domowej (Sus scrofa domestica L.) w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży".

Ogólna charakterystyka

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Marleny Gudelskiej została zrealizowana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. Niny Smolińskiej oraz promotora pomocniczego Pana dr. Kamila Dobrzynia. Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego OPUS-13 (2017/25/B/NZ9/00040) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki , którego kierownikiem była Pani Promotor. Praca doktorska składa się z cyklu trzech stanowiących spójną całość oryginalnych artykułów opublikowanych w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR):

1) **Gudelska M**., Dobrzyń K., Kieżun M., Rytelewska E., Kisielewska K., Kamińska B., Kamiński T., Smolińska N. 2020. The expression of chemerin and its receptors (CMKLR1, GPR1, CCRL2) in the porcine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy and in trophoblasts and conceptuses. *Animal*, 14(10), 2116–2128. DOI: 10.1017/S175173112000097X (IF = 3,240; pkt. = 200)

2) **Gudelska M.**, Dobrzyń K., Kieżun M., Kisielewska K., Rytelewska E., Kamiński T., Smolińska N. 2023. The effect of oestradiol and progesterone on chemerin system expression in the porcine endometrium during early pregnancy and the mid-luteal phase of the oestrous cycle. *Theriogenology*, 196:186-201. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.11.011 (IF = 2,923; pkt.= 140)

3) **Gudelska M**., Dobrzyń K., Kieżun M., Kisielewska K., Rytelewska E., Kamiński T., Smolińska N. 2022. Chemerin affects P4 and E2 synthesis in the porcine endometrium during early pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 945. DOI: 10.3390/ijms23020945 (IF = 6,208; pkt. = 140)

Sumaryczny współczynnik odziaływania (IF, impact factor) czasopism jest wysoki i wynosi 12,371, natomiast suma punktów MEIN to 480. We wszystkich przedłożonych do oceny publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Publikacje są wieloautorskie (od siedmiu do ośmiu autorów). Z dołączonych do rozprawy doktorskiej oświadczeń wynika, że Pani mgr Marlena Gudelska brała udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, analizie i zarządzaniu danymi, pozyskaniu materiałów, przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, opracowaniu i walidacji wyników, opracowaniu graficznym, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi recenzentom. Uważam, że wkład Doktorantki w powstanie publikacji wchodzących w skład Jej rozprawy doktorskiej jest wystarczający i nie budzi zastrzeżeń.

Cykl publikacji stanowi stanowiących zasadniczą część rozprawy doktorskiej, poprzedza polskojęzyczne opracowanie (41 stron), w skład którego wchodzi: spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp, zakończony sformułowaniem hipotezy oraz zadań badawczych, materiał i metody badawcze, wyniki, podsumowanie i wnioski oraz bibliografia. Pod względem formalnym rozprawa doktorska mgr Marleny Gudelskiej spełnia wymogi stawiane tego typu opracowaniom.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Tematyka badawcza ocenianej rozprawy dotyczy roli chemeryny w macicy. Celem badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej było określenie profili ekspresji chemeryny i jej receptorów (systemu chemerynowego) w macicy podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży oraz w zarodkach i trofoblastach świni domowej. Ponadto, Doktorantka zbadała wpływ chemeryny na proces steroidogenezy w błonie śluzowej macicy (endometrium). Badania przeprowadzono na modelu świni domowej, która wykazuje wiele podobieństw anatomicznych i fizjologicznych do człowieka, a dodatkowo jest ważnym gatunkiem zwierząt gospodarskich.

Przedmiot badań - chemeryna jest hormonem produkowanym głównie przez tkankę tłuszczową, który odgrywa rolę w regulacji homeostazy energetycznej, a także w reakcji zapalnej i modulacji odpowiedzi immunologicznej, dzięki czemu dzięki czemu zaliczana jest zarówno do adipokin i cytokin. Obecność chemeryny stwierdzono także w tkankach układu rozrodczego samicy, np. jajniku i macicy; oraz łożysku. Dotychczas niewiele wiadomo było na temat roli, jaką chemeryna pełni w macicy. Dane literaturowe wskazują na istotną funkcję chemeryny jako łącznika integrującego metabolizm energetyczny i funkcjonowanie układu rozrodczego. Uzyskane wyniki są niezwykle ciekawe w kontekście powiązania roli czynników uwalnianych przez tkankę tłuszczową z procesami rozrodczymi. Tematyka ta wpisuje się i doskonale uzupełnia nurt badań prowadzonych przez zespól badawczy Pani prof. dr hab. Niny Smolińskiej.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej były już poddane wnikliwiej analizie przez redakcje czasopism i recenzentów, a fakt ich opublikowania w dobrych czasopismach świadczy o ich istotnej wartości naukowej. Uzyskane wyniki znacznie poszerzają dotychczasową wiedzę na temat funkcjonowania systemu chemerynowego w macicy i zarodku oraz udziału chemeryny w regulacji procesów rozrodczych u samic świni domowej. Cytowania publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej można już zaleźć w literaturze światowej. Prace stanowią logiczny układ, są napisane zrozumiale, zawierają szczegółowy opis metod, wyników,

A.W.

a także prawidłowo przeprowadzoną dyskusję. Na podkreślenie zasługuje fakt, że oceniane publikacje są spójne pod względem tematycznym i metodycznym. Pomimo uzyskania licznych wyników, Doktorantka zaprezentowała je w sposób zwięzły, staranny i logiczny.

W pierwszej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej, Doktorantka wykazała, że ekspresja genów i białek sytemu chemerynowego oraz zawartość chemeryny w macicy zależna jest od fazy cyklu rujowego i wczesnej ciąży, co wynika prawdopodobnie ze statusu hormonalnego badanych zwierząt. Ekspresja chemeryny i jej receptorów zmienia się również w zarodkach i trofoblastach podczas poszczególnych dni wczesnej ciąży. Jednym z istotnych wyników tej pracy jest wykazanie wysokiego stężenia chemeryny w płynie pochodzącym ze światła macicy w okresie matczynego rozpoznania ciąży oraz implantacji zarodków (kilkukrotny wzrost w porównaniu z środkową fazą lutealną cyklu rujowego). Należy podkreślić, że są to pierwsze tak kompleksowe badania dotyczące obecności systemu chemerynowego w macicy oraz w trofoblastach i zarodkach świni domowej. Uważam, że ciekawym zagadnieniem do kontynuacji badań w tym zakresie, byłoby określenie czy istnieją różnice w ekspresji systemu chemerynowego pomiędzy różnymi typami komórek endometrium.

Na podstawie wyników pierwszej pracy postawiono hipotezę, że ekspresja genu i sekrecja chemeryny oraz ekspresja genów i białek receptorów chemeryny w błonie śluzowej macicy jest regulowana przez hormony steroidowe. Doktorantka zweryfikowała tę hipotezę w drugiej publikacji, w której wykazała, że zarówno estradiol jak i progesteron regulują ekspresję systemu chemerynowego w błonie śluzowej macicy w okresie wczesnej ciąży. W mojej ocenie, jednym z istotnych i ciekawych odkryć tej pracy było określenie, że estradiol zwiększa sekrecję chemeryny przez endometrium *in vitro* w okresie matczynego rozpoznania ciąży.

Celem trzeciej publikacji wchodzącej w skład ocenianej rozprawy było zbadanie wpływu chemeryny na jedną z funkcji endometrium, jaką jest synteza hormonów steroidowych. Doktorantka wskazała we wstępie publikacji, że oprócz jajnika, źródłem steroidów może być macica, a steroidy są jednymi ze znaczących czynników zaangażowanych w proces matczynego rozpoznania ciąży i utrzymania ciąży u świni domowej. Pewien niedosyt budzi brak wyjaśnienia, że synteza estradiolu przez endometrium w czasie ciąży może być procesem, który uzupełnia kluczowy mechanizm matczynego rozpoznania ciąży u świni, jakim jest synteza i wydzielenie tego steroidu przez zarodki. Uważam, że jednym z istotnych odkryć publikacji, która ukazała się w *Int. J. Mol. Sci.,* jest wykazanie, że chemeryna zwiększa ekspresję białek enzymów zaangażowanych w steridogenezę i stymuluje sekrecję estradiolu przez endometrium *in vitro* w dniu 10.-11. ciąży, czyli we wspomnianym wyżej okresie ciąży. Doktorantka sugeruje, że chemeryna może wpływać na steroidogenezę oraz sekrecję estradiolu i progesteronu przez endometrium w poszczególnych dniach ciąży/cyklu rujowego poprzez szlaki ścieżki sygnałowej MAPK oraz Akt.

Publikacjom wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej towarzyszy opracowanie w języku polskim. Obejmuje ono 41 stron. Chciałabym podkreślić, że ta część pracy została przygotowana starannie i estetycznie oraz poprawnie pod względem merytorycznym i językowym. We Wstępie Doktorantka jasno wprowadza czytelnika w temat, bardzo krótko omawiając funkcję endokrynną tkanki tłuszczowej oraz charakteryzuje chemerynę i jej receptory. Następnie Autorka dokonuje przeglądu dotychczasowej wiedzy na temat udziału chemeryny w regulacji procesów

A.W.

rozrodczych. Według mojej oceny we wstępie opracowania w języku polskim zabrakło uzasadnienia dlaczego badano wpływ chemeryny na proces steroidogenzy w endometrium.

W dalszej części opracowania polskojęzycznego znajdują się jasno i poprawnie sformułowane hipoteza główna i hipotezy szczegółowe oraz zadania badawcze. Cele pracy zostały zrealizowane dzięki odpowiednio zaplanowanym doświadczeniom opisanym w rozdziale Materiał i Metody badawcze. Zamieszczenie schematów i tabel znacznie ułatwia czytanie tej części pracy. Należy podkreślić różnorodność analiz, co świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę wszechstronnego warsztatu badawczego. Stosowane metody to: real-time PCR, Western blot, test immunoenzymatyczny (ELISA), analiza radioimmunologiczna, doświadczenia *in vitro* z wykorzystaniem inkubacji skrawków tkanki endometrium. W kolejnym rozdziale, Autorka przedstawiła najważniejsze wyniki badań. Opracowanie zamyka posumowanie oraz cztery poprawnie sformułowane wnioski.

Pytania i uwagi

Lektura rozprawy doktorskiej Pani mgr Marleny Gudelskiej nasunęła mi kilka pytań i uwag, zarówno natury merytorycznej, jak i redakcyjnej, które przedstawiam poniżej.

1. Badanie funkcji endometrium ograniczone do jednego procesu (steroidogenezy) mogą sugerować, że steroidogeneza w endometrium świni jest kluczowym procesem zachodzącym w tej tkance podczas ciąży. Dla zrównoważenia tej myśli zabrakło w opracowaniu polskim i trzeciej publikacji podania informacji, co jest istotnym źródłem estradiolu podczas procesu matczynego rozpoznania ciąży u świni.
2. Proszę o wyjaśnienie na jakie inne funkcje endometrium (oprócz steroidogenezy) może wpływać chemeryna?
3. Czy metodą ELISA mierzona była zawartość aktywnej formy badanego czynnika czy zbadano sumę chemeryny i jej prekursora?
4. Jak zdaniem Doktorantki można wytłumaczyć najniższy poziom ekspresji białka w endometrium w dniu 12.-13. ciąży przy jednoczesnej najwyższej koncentracji tego białka w płynie macicznym w tym okresie? Ponadto, wydaje się być zaskakującym wykazanie najwyższego stężenia białka chemeryny w płynie macicznym przy towarzyszącej niskiej ekspresji jej receptorów w endometrium. Proszę o przedstawienie swojej opinii interpretującej te wyniki.
5. Endometrium składa się z różnych typów komórek. Badania przedstawione w pracy doktorskiej obejmują całą tkankę. Niektóre wyniki badań *in vitro* dotyczące wpływu chemeryny na całą tkankę wydawały się trudne do wyjaśnienia (np. uwaga z pkt. 4). Proszę Doktorantkę o przedstawienie swojego poglądu czy podobne badania *in vitro*, ale różnicujące wpływ chemeryny na poszczególne typy komórek endometrium mogłyby dać inne wyniki od tych uzyskanych na eksplantatach tkankowych endometrium? Czy na któryś typ komórek endometrium świni chemeryna mogłaby działać w większym stopniu niż na inne komórki endometrium? Które komórki endometrium świni mogą być głównym źródłem chemeryny?
6. Ograniczenie badań do jednego okresu w zadaniu 5 wydaje się być zrozumiałe. Natomiast nie podano, ani w opracowaniu polskojęzycznym, ani w trzeciej publikacji wchodzącej w skład rozprawy, uzasadnienia wyboru do badań endometrium pobranego w dniu 10.-11. cyklu rujowego. Proszę podać uzasadnienie wyboru tego okresu.

M.W.

7. Proszę rozwinąć myśl głównego wniosku, że chemeryna może być czynnikiem utrzymującym prawidłowe środowisko dla rozwijających się zarodków.
8. Mimo widocznej dużej staranności w przygotowaniu rozprawy doktorskiej, Autorce nie udało się uniknąć kilku błędów i nieścisłości, które z obowiązku recenzenta wymienię:

   - w pierwszej publikacji prawidłowo użyto terminu „conceptus" (czyli zarodek wraz z trofoblastem) w dniu 15.-16. ciąży, natomiast w przypadku tkanek z 27. do 32. dnia ciąży występuje rozbieżność w stosowanych terminach w metodyce i wynikach. W metodyce stwierdzono, że rozdzielano zarodki („embryo") od kosmówki pochodzącej z trofoblastu. W mojej ocenie w opisie wyników zaprezentowanych na wykresach Ryc. 4a dotyczących 27.-32. dnia ciąży Doktorantka powinna użyć terminu „embryo" (sam zarodek), a nie jak przedstawiono „conceptus", czyli zarodek wraz z trofoblastem (kosmówką).

   - w pierwszej publikacji wykresy dotyczące ciąży oraz wybranych dni cyklu rujowego vs. ciąży powtarzają dane z okresu ciąży. Można by było tego uniknąć pozostawiając same wykresy cykl rujowy vs. ciąża.

   - czy w metodyce publikacji drugiej i trzeciej w opisie warunków inkubacji nie powinno być „w atmosferze 5% dwutlenku węgla i 95% powietrza" zamiast „w atmosferze 5% dwutlenku węgla i 95% tlenu"?

   - na str. 12 i innych stronach opracowania w języku polskich jest „adipokiny" zamiast „badanej adipokiny" lub „tej adipokiny"; „ne" zamiast „nie" na str. 13; „bufor lityczny" zamiast „bufor lizujący" lub „bufor do homogenizacji tkanek" na str. 21; „enzymy steroidogeniczne" zamiast „enzymy steroidogenne" str. 14, 32;

Pragnę jednak zaznaczyć, że nieliczne uwagi krytyczne zawarte w recenzji w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej całej pracy. Większość moich uwag ma charakter dyskusyjny i zachęca do wymiany poglądów, nie decydując jednak o całościowym odbiorze ocenianej pracy doktorskiej.

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera elementy nowatorskie i wartościowe dane, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach indeksowanych w bazie JCR i stanowią cenne uzupełnienie wiedzy z zakresu biologii rozrodu. Realizacja zaplanowanych zadań wymagała dużego nakładu pracy. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych badań, opanowaniem warsztatu badawczego oraz znajomością nowoczesnych metod eksperymentalnych. Doktorantka zdobyła niezbędne doświadczenie i umiejętności konieczne w pracy naukowej.

A.W.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska pt: "Rola chemeryny w macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica L.*) w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży" stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i w pełni spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (DZ.U. 2023, 742 z późn. zm.). W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Marleny Gudelskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy zaprezentowanych wyników badań oraz zakres i kompleksowość prac, co znajduje odzwierciedlenie w opublikowaniu ich w międzynarodowych czasopismach naukowych, indeksowanych w bazie JCR (Jouranl Citation Reports), pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy.

Agnieszka Wacławik

dr hab. Agnieszka Wacławik, prof. PAN