Kraków, 10 czerwca 2024 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

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

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr inż. Karoliny Szymańskiej
pt. *"Rola wisfatyny w regulacji funkcji przedniego płata przysadki świni domowej (Sus scrofa domestica L.)"*

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Karoliny Szymańskiej, zatytułowana *"Rola wisfatyny w regulacji funkcji przedniego płata przysadki świni domowej (Sus scrofa domestica L.)"*, została wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Tadeusza Kamińskiego oraz promotora pomocniczego dr Marty Kieżun. Na rozprawę składają się dwie oryginalne publikacje naukowe o bardzo spójnej tematyce, obejmującej zagadnienia dotyczące wpływu wisfatyny na funkcje przysadki mózgowej świni domowej w cyklu rujowym i wczesnej ciąży. Podjęty zakres badań podstawowych wpisuje się w dyscyplinę nauki biologiczne. Obie prace zostały opublikowane w 2023 roku w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach z bazy Journal Citation Reports, tj. *Scientific Reports* oraz *Cells*. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, *imapct factor*) czasopism wynosi 10.996, a suma punktów wg. aktualnego komunikatu Ministra Edukacji i Nauki to 280. Do publikacji dołączono także obszerne *Supplementary data*. Prace są opracowaniami wieloautorskimi, liczącymi odpowiednio 11-stu i 14-stu współautorów. W każdym z artykułów Doktorantka jest pierwszym autorem, a Jej indywidualny wkład w ich powstanie potwierdzają dołączone oświadczenia wszystkich autorów. Wynika z nich, że Pani Karolina Szymańska brała udział w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, weryfikacji danych, przeprowadzeniu badań, walidacji wyników, przygotowaniu manuskryptu, analizie formalnej i redagowaniu tekstu. Informacje te są tożsame z treścią *Author Contributions* zamieszczonych w obu publikacjach. Na podstawie przedłożonych deklaracji stwierdzam, że zaangażowanie i wkład Doktorantki w prowadzenie badań oraz

przygotowanie oryginalnych publikacji jest istotny. Jednakże w związku z liczbą współautorów prac oraz zadeklarowanym przez nich udziale w przygotowanie publikacji, nie potrafię ocenić jego skali. Z tego względu, łatwiejsze w interpretacji dla Recenzenta byłoby wskazanie, które analizy zostały wykonane przez Doktorantkę, a które przez pozostałych współautorów, co w mojej ocenie nie byłoby trudne ze względu na obszerne dane eksperymentalne przedstawione w publikacjach.

Do publikacji oraz oświadczeń współautorów dołączono opracowanie w języku polskim o typowym układzie. Na 46 stronach znajdują się kolejno spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenie do tematyki pracy, szczegółowy opis celu i zakresu badań, opis materiałów i metod, przedstawienie wyników, podsumowanie i wnioski, bibliografia w liczbie 29 pozycji oraz spis tabel. Ta część pracy została przygotowana poprawnie, uzasadniając podjęcie tematyki badań przez Doktorantkę. Wstęp opracowania polskojęzycznego pozostawia pewien niedosyt odnośnie opisu roli wisfatyny w rozrodzie samic oraz mechanizmu jej działania, co prawdopodobnie może wynikać z ograniczonych danych literaturowych na ten temat. Rozdział „Materiały i metody" został napisany starannie i czytelnie. Przedstawiony w nim opis przeprowadzonych doświadczeń oraz zastosowanych technik badawczych został dokonany z należytą skrupulatnością, co umożliwia ich prześledzenie oraz powtórzenie. Zastosowane metody badawcze zostały dobrane odpowiednio do weryfikacji hipotezy badawczej i osiągnięcia zdefiniowanych przez Doktorantkę celów badawczych. W moim odczuciu, bardzo pomocy w śledzeniu zaplanowanych analiz byłby obrazujący je schemat. Opis uzyskanych wyników jest przejrzysty i adekwatny do ich graficznej prezentacji w obu publikacjach. **Po zapoznaniu się z materiałami stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim w rozumieniu zapisu art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.**

W niniejszej pracy Doktorantka podjęła się weryfikacji hipotezy badawczej zakładającej, że ekspresja genu i koncentracja białka wisfatyny w komórkach przysadki mózgowej świni zależy od statusu hormonalnego zwierząt związanego z fazą cyklu rujowego i okresem wczesnej ciąży. Ponadto postawiła hipotezę zakładającą, że wisfatyna uczestniczy w kontroli proliferacji i apoptozy komórek przysadki, a poprzez aktywację/inhibicję szlaków INSR, PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2 i AMPK wpływa na regulację funkcji sekrecyjnych komórek przysadki mózgowej świni. Cel pracy został

określony jednoznacznie i znajduje uzasadnienie w dotychczasowym stanie wiedzy. Doktorantka sprecyzowała również siedem celów szczegółowych, służących weryfikacji postawionych hipotez badawczych. **Podsumowując powyższe stwierdzam, że realizacja celu naukowego postawionego w dysertacji Pani mgr inż. Karoliny Szymańskiej istotnie prowadzi do poszerzenia dotychczasowego stanu wiedzy oraz stanowi przyczynek do rozwiązania oryginalnego problemu badawczego, spełniając tym samym wymóg ustawy stawiany pracom doktorskim.**

Pracę doktorską, jak już zaznaczono powyżej, stanowi cykl dwóch opublikowanych artykułów naukowych, których wartość merytoryczną oceniam pozytywnie. Pierwsza z cyklu praca opublikowana w *Scientific Reports* przedstawia zależną od fazy cyklu oraz okresu ciąży ekspresję transkryptu oraz białka wisfatyny w komórkach przedniego i tylnego płata przysadki mózgowej świni. Zbadano również kolokalizację wisfatyny z LH, FSH, ACTH, TSH, PRL i GH w środkowej fazie lutealnej. Ponadto wykazano, że GnRH, FSH, LH i INS stymulowały wydzielanie wisfatyny przez komórki przedniego płata przysadki mózgowej w 17.-19. dniu cyklu rujowego, podczas gdy w 2.-3. dniu cyklu odnotowano tylko wpływ LH. W drugiej publikacji, która ukazała się w czasopiśmie *Cells*, przedstawiono wpływ wisfatyny *in vitro* na podstawowe oraz indukowane przez GnRH i INS wydzielanie gonadotropin przez komórki przedniego płata przysadki mózgowej świni. Wykazano również indukcję proliferacji tychże komórek, bez wpływu na ich apoptozę. Ponadto zaobserwowano, że wisfatyna aktywuje wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnalizacyjne tj. INSR, PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2 oraz AMPK, co potwierdzono poprzez zastosowanie specyficznych inhibitorów tych szlaków. Powyższe prace stanowią logiczny układ, są napisane zrozumiale, z jasno postawionymi celami, szczegółowym opisem metod analitycznych oraz wyników, a także prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. **W związku z tym stwierdzam, że w/w prace stanowią spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, co spełnia warunek ustawy określający wymogi stawiane pracom doktorskim.**

W podsumowaniu analizy uzyskanych przez Panią Karolinę Szymańską wyników stwierdzam, że Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania i prowadzenia badań naukowych, a dzięki temu potrafi rozwiązać sformułowany problem naukowy. Wykazała się także wiedzą teoretyczną w zakresie podjętej tematyki badawczej, co potwierdzają krytyczne dyskusje przedstawione w publikacjach. **Wskazuje to na spełnienie ustawowych kryteriów jakimi powinien charakteryzować się kandydat do stopnia doktora.**

Czytając tę bardzo interesująca rozprawę, nasunęły mi się pytania i uwagi, o ustosunkowanie się do których proszę Doktorantkę podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej:

1. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań są niewątpliwie nowatorskie, ale jednocześnie trudne w interpretacji. W związku z tym, że wisfatyna jest adipokiną produkowaną przede wszystkim w tkance tłuszczowej, jaką rolę może ona pełnić w przysadce mózgowej i czy jej obecność może być związana z procesami innymi niż te rozrodcze?
2. Doktorantka we Wstępie pracy pisze, że wisfatyna może działać poprzez różne receptory – insulinowy, dla chemokin oraz toll-podobny receptor 4. Czy ekspresja tych receptorów została dotychczas potwierdzona w komórkach przysadki mózgowej? Pomogłoby to znacznie w zrozumieniu mechanizmu działania wisfatyny.
3. W „Podsumowaniu i wnioskach" Doktorantka stwierdza, że *występowanie transkryptu i białka wisfatyny w przysadce mózgowej* świni sugeruje jej lokalną syntezę. Czy Doktorantka rozważała możliwość magazynowania w przysadce mózgowej wisfatyny z osocza?
4. W publikacji drugiej, do określenia aktywacji receptora insuliny (formy total oraz fosforylowanej) wykorzystano technikę immunoenzymatyczną, natomiast aktywację pozostałych szlaków sygnalizacyjnych badano metodą Western blot? Proszę o wyjaśnienie takiego podejścia.
5. Sformułowanie „komórki pęcherzykowe" (strona 9 opracowania polskojęzycznego) nie jest poprawne. Należało wskazać, o który typ komórek pęcherzyka jajnikowego chodzi – komórki ziarniste czy komórki osłonki.
6. W całym opracowaniu polskojęzycznym Doktorantka stosuje określenie „immunohistochemia fluorescencyjna". Sugerowałbym raczej użycie określenia „immunofluorescencja".
7. Stwierdzenie „wisfatyna bierze udział w regulacji procesów rozrodczych" (strona 11 opracowania polskojęzycznego) uważam za zbyt śmiałe. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że raczej może ona brać pośrednio udział w regulacji procesów rozrodczych u samic.
8. W opracowaniu polskojęzycznym pojawiają się drobne błędy stylistyczne, np. „wisfatyna uczestniczy kontroli" (strona 9).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Karoliny Szymańskiej pt. "*Rola wisfatyny w regulacji funkcji przedniego płata przysadki świni domowej (Sus scrofa domestica L.)*" stanowi wartościowe i oryginalne dzieło naukowe o znaczącym wkładzie w poszerzenie dotychczasowego stanu wiedzy z zakresu endokrynologii i biologii rozrodu, a uzyskane wyniki wnoszą nowe informacje do dyscypliny nauki biologiczne. Uwagi zawarte w niniejszej recenzji nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Przedłożona dysertacja spełnia wszystkie wymagania określone w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (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 inż. Karoliny Szymańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z wyrazami szacunku,

dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ