Dr hab. n. biol. Roman Paduch, prof. UMCS
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Instytut Nauk Biologicznych
Katedra Wirusologii i Immunologii

Lublin, dn. 07.05.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr inż. Karoliny Szymańskiej**
pt. " Rola wisfatyny w regulacji funkcji przedniego płata przysadki świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)"
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Kamińskiego,
promotor pomocniczy: dr Marta Kieżun

Rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Szymańskiej to monotematyczny zestaw 2 publikacji o łącznym, wysokim współczynniku oddziaływania IF wynoszącym 10,6 i 240 punktów MNiSW. Zakres zainteresowań Doktorantki zawarty w obu pracach dotyczył funkcji wisfatyny, jednej z adipokin, w potencjalnej regulacji aktywności dokrewnej przedniego płata przysadki mózgowej w modelu świni domowej. Adipokiny należą do grupy substancji o charakterze hormonalnym wytwarzanych przez tkankę tłuszczową. Biosynteza oraz uwalnianie całej grupy tych bioaktywnych białek wpływa nie tylko na lipogenezę i lipolizę, lecz również na drodze endo/auto/parakrynnej regulowane jest funkcjonowanie innych tkanek i całych narządów. Jedną z później odkrytych adipokin jest wisfatyna. Jest to białko o cechach

insulinomimetycznych, które może bezpośrednio wiązać się z receptorem dla insuliny. Wykazuje więc właściwości hipoglikemiczne. Wzrost jej poziomu może jednak wynikać również ze zmian metabolicznych stanowiących mechanizm kompensacyjny rozwijającej się insulinooporności. Jednym z ciekawszych zagadnień podejmowanych w badaniach naukowych nad adipokinami, w tym nad wisfatyną, jest ich udział w mechanizmach czynnościowej regulacji osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej. Badania skupiają się na regulacji bilansu energetycznego na drodze powiązania funkcjonowania narządów dokrewnych z dystrybucją tkanki tłuszczowej i roli adipokin. Badania dotyczą jednak najczęściej opisywanych adipokin a mianowicie leptyny, rezystyny oraz adiponektyny. Wisfatyna jest tym kontekście, lecz również innych zjawiskach tkankowych, mało poznana. Na uwagę zasługuje więc podjęte przez Doktorantkę zagadnienie dotyczące nie tylko ogólnego poznania biologicznej roli wisfatyny, lecz określeniu jej znaczenia w przysadce mózgowej świni domowej w wielowątkowym badaniu. Autorka skupiła się na wykazaniu, że lokalne stężenie badanej adipokiny zależne jest od fazy cyklu rujowego i wczesnej ciąży u świni domowej, a tym samym od stanu hormonalnego zwierzęcia. Ponadto Autorka podjęła się zadania wskazującego, że wisfatyna bierze czynny udział w rozwoju i komórkowym remodelingu przysadki mózgowej na drodze indukcji proliferacji i apoptozy komórek. Ostatnim zadaniem związanym z przeprowadzonymi badaniami było wykazanie, że wisfatyna jest czynnikiem regulującym funkcje sekrecyjne przysadki mózgowej w badanym modelu zwierzęcym.

Autorzy zaangażowani w badania stanowią zespół prowadzący zaawansowane, wielokierunkowe analizy dotyczące roli adipokin w modelu świni domowej. Oceniane w rozprawie doktorskiej badania wpisują się więc w cykl eksperymentalny prowadzony w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt UWM. Wykonanie badań podstawowych oceniających rolę wisfatyny w kontroli funkcjonowania przysadki mózgowej u świni domowej może mieć również ciekawe implikacje praktyczne, szczególnie w powiązaniu z innymi osiągnięciami na tym polu badawczym. Uważam więc że wykonanie badań w tej tematyce niesie ze sobą istotne

korzyści, a tym samym jest potrzebne. Na tej podstawie uważam wybór tematu rozprawy doktorskiej za uzasadniony.

Przedłożona do recenzji dysertacja doktorska zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim. Autorka zawarła w nim niezbędne informacje dotyczące założeń badawczych, stosowanych metod eksperymentalnych oraz osiągniętych celach wraz z podsumowującymi wnioskami. Wstęp rozprawy w bardzo zwięzły sposób przedstawia podłoże teoretyczne zagadnień podjętych w części eksperymentalnej. Dalsza część, to poprawnie sformułowany i przedstawiony cel badań, zastosowane metody analityczne, wyniki eksperymentów oraz podsumowanie wraz z wnioskami. Zasadniczym, ocenianym elementem przedstawionej dysertacji doktorskiej jest wspomniany już zestaw dwóch prac eksperymentalnych. Są one pracami zespołowymi, z wiodącym udziałem Doktorantki będącej pierwszym autorem. Ponadto zawarte w obu publikacjach dane dotyczące udziału poszczególnych współautorów w powstanie pracy również wskazują na istotny wkład Doktorantki. Brała udział w realizacji większości elementów składających się na pełną realizację badań, w tym wiodący parametr, a mianowicie koncepcję pracy. Ważnym, z punktu widzenia możliwości wykonania badań, było uzyskanie finansowania na ich realizację w postaci projektu NCN.

Prace doświadczalne stanowiące podstawę do ubiegania się o stopień doktora opublikowane zostały w roku 2023. Z uwagi na niedawne przedstawienie prac szerokiemu gremium, nie mają jeszcze wielu cytowań. Na koniec kwietnia 2024 roku, zgodnie z danymi zawartymi w bazie SCOPUS, były to w sumie 3 cytowania będące autocytowaniami współautorów obu prac. Myślę, że wiąże się to jeszcze z innym faktem, a mianowicie dość niszowym zagadnieniem, dodatkowo opracowywanym na wymagającym materiale zwierzęcym. Nie zmienia to jednak faktu konieczności wykonywania tego typu badań oraz istotności podjętego problemu badawczego. Dodatkowo, fakt opublikowania ich w uznanych czasopismach naukowych wskazują na wysoki poziom merytoryczny opracowywanego zagadnienia.

Obie oceniane prace są ściśle tematycznie ze sobą związane, a zagadnienia podjęte w pierwszej z nich stanowią punkt wyjścia do postawienia hipotezy badawczej zawartej w drugim

opracowaniu. Punktem wspólnym obu prac jest założenie regulacyjnej roli wisfatymy w kontekście prawidłowej funkcji przysadki mózgowej świni domowej. Cele badawcze obu prac realizowane były w oparciu o uznane metody eksperymentalne, w tym real-time PCR, western blotting, immunohistochemia, testy proliferacyjne, cytometria przepływowa, czy metody immunoenzymatyczne. Materiałem do badań były przysadki mózgowe izolowane od dojrzałych płciowo loszek świni domowej.

W pierwszej pracy zaliczonej do rozprawy doktorskiej (**Szymańska K. i wsp., Scientific Reports, 2023**), Autorka stwierdziła lokalne wytwarzanie wisfatyny w przysadce mózgowej świni domowej, które było zależne od stanu hormonalnego zwierzęcia, w tym przypadku z cyklem rujowym lub ciążą. Autorka uściśliła również zakres hormonów wpływających na poziom badanej adipokiny w przednim płacie przysadki mózgowej wskazując na istotną rolę hormonu uwalniającego gonadotropiny (GnRH), hormonu folikulotropowego (FSH), hormonu luteinizującego (LH) oraz dodatkowo insuliny (INS). Doktorantka wykazała, więc że poziom wisfatyny zależny był od innych hormonów (GnRH, FSH, LH). Działały one jednak w innych fazach cyklu rujowego zwiększając lokalne stężenie wisfatyny. Sugeruje to istnienie potencjalnych zależności między fazą cyklu, wisfatyną a stężeniem konkretnego analizowanego hormonu. Proszę Doktorantkę o sugestię jak zależności te mogą przełożyć się, np. na utrzymywanie ciąży oraz co może być przyczyną wystąpienia takich określonych relacji między wisfatyną, a badanymi hormonani w różnym czasie cyklu? Czy można wisfatynę, a przypuszczalnie i inne adipokiny, uważać za kofaktory prawidłowych procesów w osi podwzgórze-przysadka-gonady? A może to coś więcej?

W drugiej pracy zaliczonej do cyklu rozprawy doktorskiej (**Szymańska K. i wsp., Cells, 2023**) wykazano, że wisfatyna może wpływać na poziom hormonu luteinizującego oraz folikulotropiny uwalnianych przed przedni płat przysadki mózgowej świni domowej. Odbywać się to może poprzez regulację proliferacji komórek tego narządu oraz na drodze szlaków molekularnych AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK. Autorka podsumowała ten etap badań wskazując, na

podstawie uzyskanych wyników, że wisfatyna może regulować funkcje przysadki mózgowej świń w zależności od dawki oraz fazy cyklu rujowego.

Po lekturze drugiej pracy oraz opisów w dysertacji nasunęły mi się dodatkowe pytania. Doktorantka używała kamptotecynę (irynotekan) (CPT-11) jako kontrolę odniesienia w badaniach nad apoptozą komórek przysadki. Cytostatyk ten jest inhibitorem topoizomerazy I DNA. Jest to lek, według National Cancer Institute, stosowany w monoterapii lub terapii skojarzonej głównie raka jelita grubego. Jest również wykorzystywany jako cytostatyk w terapiach innych nowotworów jak drobno- i niedrobnokomórkowy rak płuca, rak szyjki macicy, czy nowotwory głowy i szyi. Chciałbym dowiedzieć się jakie przesłanki przyświecały wyborowi właśnie tego cytostatyku w przeprowadzonych badaniach?

Trzecie pytanie do Doktorantki dotyczy użyteczności przeprowadzonych badań. Jakie praktyczne zastosowanie można zasugerować na podstawie uzyskanych wyników?

Niezależnie od postawionych pytań, uważam że Autorka wniosła istotny wkład w zrozumienie roli adipokin, a konkretnie wisfatyny w regulacji funkcjonowania przysadki mózgowej u świni domowej. Ponadto wykazała rolę tego białka w kontekście funkcjonowania sieci hormonów związanych z aktywnością tego gruczołu dokrewnego.

Biorąc pod uwagę złożone do oceny materiały, stwierdzam że mgr inż. Karolina Szymańska udowodniła hipotezę badawczą postawioną we wstępnej fazie realizacji dysertacji doktorskiej. Badania były dobrze zaplanowane i konsekwentnie realizowane. Obie oceniane prace są ze sobą ściśle związane stanowiąc jednolitą całość. Badania stanowią nowy wkład do wiedzy ogólnej dotyczącej roli adipokin w funkcjonowaniu układu dokrewnego świni domowej. Wnioski uzyskane na podstawie tych badań zostały sformułowane poprawnie. Moim zdaniem Doktorantka wypełniła zadania, jakie zostały postawione w celu pracy, a zakres przedstawionych analiz w pełni odpowiada tytułowi rozprawy.

UMCS

Podsumowując, poddane ocenie badania stanowią istotny i oryginalny wkład Doktorantki w rozwój nauk zarówno biologicznych na poziomie zdobywania wiedzy ogólnej jak i weterynaryjnych mogących zostać wykorzystane w poprawie wyników hodowlanych. Przedstawiony zestaw 2 prac stanowi powiązaną, uporządkowaną całość, wpisującą się w rozwój wiedzy w zakresie roli adipokin w funkcjonowaniu narządów układu dokrewnego. W mojej opinii, przedstawioną pracę doktorską należy ocenić wysoko.

Rozprawa doktorska jest więc opracowaniem spełniającym wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 ze zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie **mgr inż. Karoliny Szymańskiej** do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Z uwagi na wielowątkowość podjętych badań i wielokierunkowość wnioskowania na podstawie uzyskanych wyników wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Kierownik Katedry

Dr hab. Roman Paduch, prof. UMCS

Roman Paduch