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. Magdalena Kowalik
Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk

Olsztyn, 04.06.2024

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

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem promotora Pana prof. dr hab. Tadeusza Kamińskiego oraz promotora pomocniczego Pani dr Marty Kieżun w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Oceniana dysertacja dotyczy aktualnego problemu naukowego jakim jest określenie udziału wisfatyny w regulacji funkcji przysadki świni domowej w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży. Badania wpisują się w tematykę zainteresowań naukowych Zespołu badawczego, w którym Doktorantka realizowała pracę doktorską. Praca doktorska była realizowana w ramach projektu badawczego nr 2018/31/B/NZ9/00781 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Oceniana rozprawa doktorska składa się z dwóch części: opracowania w języku polskim oraz dwóch oryginalnych publikacji naukowych – niżej wyszczególnionych – wraz z oświadczeniami współautorów. Publikacje zostały opublikowane w języku angielskim w renomowanych czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Reports*, których wskaźniki naukometryczne są wysokie: łączny wskaźnik IF z roku opublikowania prac wynosi 10,996, a liczba punktów MEiN wynosi 280.

1. **Szymanska K,** Zaobidna E, Rytelewska E, Mlyczynska E, Kurowska P, Dobrzyn K, Kiezun M, Kaminska B, Smolinska N, Rak A, Kaminski T. 2023. Visfatin in the porcine pituitary gland: expression and regulation of secretion during the oestrous cycle and early pregnancy. Scientific Reports, 13 (1): 18253, DOI: 10.1038/s41598-023-45255-4. **(IF = 4.996; pkt. MEiN = 140)**
2. **Szymanska K,** Rytelewska E, Zaobidna E, Kiezun M, Gudelska M, Kopij G, Dobrzyn K, Mlyczynska E, Kurowska P, Kaminska B, Nynca A, Smolinska N, Rak A, Kaminski T. 2023. The Effect of Visfatin on the Functioning of the Porcine Pituitary Gland: An In Vitro Study. Cells, 12: 2835, DOI: 10.3390/cells12242835 **(IF = 6.0; pkt.MEiN = 140)**

Pierwszą część rozprawy stanowi zwięzłe, 46 stronicowe omówienie zawierające: spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cel i zakres badań, materiały i metody, wyniki, podsumowanie i wnioski, bibliografię – 29 pozycji piśmiennictwa oraz spis tabel.

W bardzo krótkim „Wstępie" Autorka omawia funkcje przysadki, charakteryzuje wisfatynę, jej potencjalne receptory oraz rolę tej adipokiny w regulacji wybranych procesów biologicznych, w tym procesów rozrodczych. Doktorantka zwraca uwagę na brak danych dotyczących obecności i roli wisfatyny w przysadce świni domowej oraz nieliczne dane dotyczące możliwego udziału tej adipokiny w regulacji procesów proliferacji i apopotozy komórek. Informacje te dały podstawę do poprawnego sformułowania celu i hipotez badawczych zakładających, że (1) *"ekspresja genu i koncentracja białka wisfatyny w komórkach przysadki świni zależy od statusu hormonalnego zwierząt związanego z fazą cyklu rujowego i okresem wczesnej ciąży"*, a także (2) *"wisfatyna uczestniczy w kontroli proliferacji i apoptozy komórek przysadki, a poprzez aktywację/inhibicję szlaków INSR, AKT/PI3K, MAPK/ERK1/2 i AMPK wpływa na regulację funkcji sekrecyjnych komórek przysadki świni"*. W celu weryfikacji hipotez Autorka zaplanowała siedem szczegółowych zadań badawczych, które następnie konsekwentnie realizowała.

Założenia pracy zostały zrealizowane przez Autorkę z sukcesem. W badaniach zastosowano pracochłonne metody badawcze takie jak: izolacja i hodowla komórek przedniego płata przysadki, analizy immunoenzymatyczne (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, analizy immunofluorescencyjne do określenia lokalizacji wisfatyny oraz jej kolokalizacji z innymi białkami, cytometrię przepływową do oznaczenia intensywności procesu apoptozy w komórkach oraz analizy statystyczne. Doświadczenia zostały starannie zaplanowane i wykonane, a metodyka badań została dokładnie opisana w rozdziale „Materiały i Metody". Całość wykonanych analiz świadczy o kompetencji metodologicznej Doktorantki oraz Jej przygotowaniu do planowania i wykonywania następnych prac eksperymentalnych. W rozdziale „Wyniki", Autorka przedstawiła najważniejsze wyniki badań zawarte w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską. Rozdział ten podzielono na podrozdziały, z których każdy dotyczył osobnego zadania badawczego, co znacznie ułatwiło analizę i interpretację wyników. W kolejnym rozdziale - „Podsumowanie i wnioski" Doktorantka przedstawiła siedem wniosków, które są raczej podsumowaniem uzyskanych wyników, natomiast wniosek znajduje się na końcu tego rozdziału. Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki odpowiadają na postawione w pracy hipotezy i stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę na temat roli wisfatyny w regulacji funkcji przysadki świni domowej. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki są nowatorskie, mają istotną wartość poznawczą i znacznie poszerzają dotychczasową wiedzę na temat udziału tej adipokiny w kontroli procesów rozrodczych u samicy świni domowej.

Opracowanie jest przygotowane klarownie i czytelnie, zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim, chociaż zdarzają się w tej części nieliczne błędy edytorskie, stylistyczne czy skróty myślowe (np. „uczestniczy kontroli" – str. 9, „wcześniej pociętej uprzednio" str. 26, „szlaków sygnałowych MAPK/ERL1/2" str. 41), na które jako recenzentka mam obowiązek zwrócić uwagę. Nie wpływają one jednak na wspomnianą wysoką ocenę dysertacji.

Drugą część rozprawy stanowią dwie oryginalne prace naukowe, opublikowane w prestiżowych czasopismach, tj. ***Scientific Reports*** i ***Cells***, w których Pani mgr inż. Karolina Szymańska jest pierwszym autorem. Publikacje są wieloautorskie, jednak do każdej publikacji Autorka dołączyła oświadczenia wszystkich współautorów prac, którzy szczegółowo określili zakres swojego zaangażowania w wykonywanie badań i przygotowanie poszczególnych publikacji do druku. Treść tych oświadczeń, jednoznacznie podkreśla wiodący wkład Doktorantki w opracowanie koncepcji i metodologii badań, weryfikację danych, przeprowadzenie badań, walidację wyników, analizę formalną tekstu oraz przygotowanie manuskryptu. W związku z tym, znaczący wkład Doktorantki w powstanie każdej z prac nie budzi wątpliwości.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Szymańskiej zostały już pozytywnie ocenione przez kompetentnych recenzentów oraz redaktorów czasopism, w których zostały opublikowane, dlatego oceniam je w aspekcie poznawczym i jako wkład w rozwój dyscypliny naukowej.

W pierwszej publikacji, opublikowanej w ***Scientific Reports*** udokumentowano obecność transkryptu i białka wisfatyny w przednim i tylnym płacie przysadki mózgowej świni oraz zmiany w ich ilości podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży, co może być związane ze statusem endokrynnym świni. Stwierdzono również obecność białka wisfatyny w komórkach gonadotropowych, tyreotropowych, somatotropowych, laktotropowych i kortykotropowych przysadki. Ponadto, w warunkach *in* vitro wykazano, że GnRH, LH, FSH i insulina zmienia koncentrację i sekrecję wisfatyny przez komórki przedniego płata przysadki w cyklu rujowym w zależności od statutu hormonalnego. Uzyskane wyniki wskazują, że wisfatyna może być produkowana lokalnie w przysadce i może wpływać na funkcje rozrodcze. Na podkreślenie zasługuje fakt, że jest to pierwsza dostępna w literaturze kompleksowa identyfikacja ekspresji wisfatyny w przysadce świni domowej.

W drugiej pracy, opublikowanej w ***Cells***, wykazano że wisfatyna w warunkach *in vitro*, zmienia podstawową i regulowaną GnRH- i/lub insuliną sekrecję LH i FSH przez komórki przedniego płata przysadki w cyklu rujowym, co wskazuje na pośredni udział tej adipokiny w kontroli układu rodnego. Stwierdzono również, że wisfatyna stymuluje proliferację komórek przedniego płata przysadki ale nie wpływa na proces apoptozy. Kolejnym odkryciem było również wykazanie, że wisfatyna modyfikuje szlaki sygnałowe INSR, Akt/PI3K, MAPK/Erk1/2 i AMPK, które są zaangażowane w sekrecję gonadotropin. Zatem wisfatyna może być zaangażowana w modulację funkcji rozrodczych przez bezpośrednie oddziaływanie w przysadce i może być elementem systemu hormonalnego łączącego status metaboliczny z rozrodem.

Powyższe publikacje są spójne tematycznie i stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego wyjaśnienia obecności i roli wisfatyny w przysadce świni domowej. Dane przedstawione w publikacjach mają charakter nowatorski, a informacje w nich zawarte wzbogacają wiedzę z zakresu endokrynnego oddziaływania hormonów tkanki tłuszczowej na funkcjonowanie układu rozrodczego samicy. Ich wartość poznawcza jest wysoka, o czym świadczy fakt ich opublikowania w bardzo dobrych czasopismach naukowych. Prace te napisane są w przemyślany sposób, z jasno sformułowanymi celami, szczegółową metodyką i prawidłowo przedstawioną dyskusją. Dokumentacja uzyskanych wyników w postaci tabel, wykresów i zdjęć oraz materiałów dodatkowych jest klarowna.

Wysoko oceniam pracę doktorską zarówno pod względem merytorycznym, jak i metodycznym, jednak mam kilka pytań i wątpliwości, o których wyjaśnienie proszę Doktorantkę podczas publicznej obrony:

1. Na jakiej podstawie wybrano dawki wisfatyny oraz modulatorów szlaków sygnałowych do doświadczeń in vitro? Taka informacja znajduje się w załączonej publikacji, ale uważam że informacje te są istotne i powinny się one znaleźć również w opracowaniu polskojęzycznym rozprawy.
2. Jak wytłumaczy Pani brak wpływu wisfatyny na proces apoptozy w komórkach przysadki w świetle badań innych autorów, którzy wskazują możliwy udział wisfatyny w regulacji procesu apoptozy?
3. Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki wskazują, że wisfatyna wpływa na procesy rozrodcze samicy. Proszę wyjaśnić zatem, jakie Pani zdaniem mechanizmy mogą być zaangażowane w przekazywanie sygnału wisfatyny w tych procesach?

Przedstawione uwagi mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej ocenianej dysertacji.

Za najważniejsze osiągnięcie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Karoliny Szymańskiej uznaję: (1) określenie ekspresji i lokalizacji wisfatyny w przysadce świni domowej; (2) wykazanie, że ekspresja

transkryptu i białka wisfatyny zależy od fazy cyklu rujowego i/lub okresu wczesnej ciąży; (3) określenie udziału GnRH, LHi FSH w regulacji sekrecji białka wisfatyny z komórek przysadki; (4) określenie wpływu wisfatyny na podstawową i stymulowaną GNRH i/lub insuliną sekrecję gonadotropin z komórek przysadki, oraz (5) wykazanie udziału wisfatyny w procesie proliferacji komórek przysadki; (6) określenie udziału wisfatyny w regulacji ścieżek sygnałowych zaangażowanych w sekrecję gonadotropin z przysadki świni domowej.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr inż. Karoliny Szymańskiej oceniam wysoko. Jest ona oryginalnym opracowaniem zawierającym nowe informacje na temat roli wisfatyny w regulacji funkcji przysadki świni domowej. Tematyka podjęta przez Autorkę jest aktualna i nowatorska, a uzyskane wyniki wzbogacają w znaczący sposób dotychczasową wiedzę na temat udziału wisfatyny w regulacji procesów rozrodczych świni. Należy podkreślić, że przeprowadzone badania wymagały od Doktorantki dużego zaangażowania i opanowania czasochłonnych technik badawczych, znajomości aktualnej literatury, opracowania i prezentacji wyników, poprawnego wnioskowania i przygotowywania publikacji do druku co predysponuje Ją do dalszej pracy naukowej.

WNIOSEK KOŃCOWY

Z pełnym przekonaniem uznaję, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Szymańskiej zatytułowana: **"Rola wisfatyny w regulacji funkcji przedniego płata przysadki świni domowej (*Sus scrofa domestica L.*)"** spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023.742 ze zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. Dlatego też, zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Karoliny Szymańskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Magdalena Kowalik

dr hab. Magdalena Kowalik