

dr hab. Katarzyna Knapczyk-Stwora, prof. UJ  
Zakład Endokrynologii  
Katedra Fizjologii Zwierząt  
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

**Ocena**  
**pracy doktorskiej mgr Katarzyny Kisielewskiej**  
**pt. "Wpływ chemeryny na funkcje przysadki świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w cyklu rujowym i wczesnej ciąży"**

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

Powszechnie wiadomo, że istnieje ścisły związek pomiędzy stanem odżywienia, a sukcesem reprodukcyjnym. Jeszcze niedawno tkanka tłuszczowa była uważana wyłącznie za miejsce magazynowania energii. Jednak w ostatnich latach coraz większe zainteresowanie budzi udział i znaczenie wytwarzanych przez adipocyty licznych aktywnych biologicznie związków (adipokin) w utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu oraz w regulacji procesów związanych z rozrodem. Jedną z nadal słabo poznanych adipokin jest chemeryna, której rola pierwotnie związana była ze stanem zapalnym. Jak dotychczas większość badań wiążących chemerynę z rozrodem skupiała się na jajniku, natomiast niewiele wiadomo o udziale systemu chemerynowego w regulacji funkcji wyższych pięter osi podwzgórze-przysadka-jajnik. Dlatego moim zdaniem wybór zakresu badawczego rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kisielewskiej jest ciekawy i w pełni zasadny. Co więcej, tematyka ta wpisuje się i doskonale uzupełnia badania prowadzone w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt UWM pod kierownictwem promotora niniejszej pracy, prof. dr hab. Tadeusza Kamińskiego.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kisielewskiej została wykonana w ramach projektu badawczego OPUS9 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki. Głównym celem dysertacji było określenie wpływu chemeryny na funkcje przysadki świni w cyklu rujowym i wczesnej ciąży poprzez realizację następujących celów szczegółowych:

1. określenia ekspresji genów chemeryny (*RARRES2*) i jej trzech receptorów (*CMKLR1*, *GPR1* i *CCRL2*) na poziomie mRNA i białka w gruczołowym i nerwowym płcie przysadki świni w różnych dniach cyklu rujowego (dzień 2.-3., 10.-12., 14.-16., 17.-19.) oraz wczesnej ciąży (dzień 10.-11., 12.-13., 15.-16., 27.-28.) przy zastosowaniu metody real-time PCR i western blot;

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: +48 12 664 50 98



2. określenia metodą immunofluorescencji komórkowej lokalizacji chemeryny i jej receptorów w gruczołowym płacie przysadki świni w 10.-12. dniu cyklu rujowego i 15.-16. dniu ciąży;
3. zbadania metodą ELISA wpływu *in vitro* chemeryny na podstawową oraz indukowaną GnRH i/lub insuliną sekrecję hormonów gonadotropowych przez komórki przedniego płata przysadki świni podczas cyklu rujowego;
4. zbadania metodą western blot wpływu chemeryny na aktywację szlaków sygnałowych Akt, MAPK/Erk1/2 i AMPK w komórkach przedniego płata przysadki świni w 10.-12. dniu cyklu rujowego.

W skład rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kisielewskiej wchodzi liczące 35 stron polskojęzyczne autorskie opracowanie oraz dwie, spójne tematycznie, anglojęzyczne prace oryginalne, opublikowane w 2020 roku w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach naukowych, indeksowanych w bazie JCR (Journal Citation Reports), o sumarycznym współczynniku oddziaływania (Impact Factor) 4,885. Obydwie prace mają charakter zespołowy i liczą aż dziewięciu współautorów. Zgodnie z wytycznymi dla przewodów prowadzonych w oparciu o prace wieloautorskie, mgr Kisielewska przedstawiła oświadczenia, w których opisano zaangażowanie każdej z osób w powstawanie publikacji. Z informacji zawartych w oświadczeniach wynika, że udział Pani mgr Kisielewskiej w powstaniu prac polegał na opracowaniu koncepcji oraz metodyki badań, pobieraniu materiału i przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, opracowaniu wyników, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu i udzielaniu odpowiedzi recenzentom podczas procesu publikacji. Doktorantka jest pierwszym autorem prac przedstawionych w dysertacji, co dokumentuje jej znaczącą rolę, aczkolwiek nigdzie nie określono procentowego udziału mgr Kisielewskiej w ich powstaniu. Powyższe publikacje stanowią logiczny układ, a tematyka konsekwentnie dąży do weryfikacji hipotezy badawczej zakładającej, że: 1/ w komórkach przysadki świni ma miejsce ekspresja chemeryny i jej receptorów, przy czym poziom ekspresji odpowiednich transkryptów i białek zależy od statusu hormonalnego związanego z fazą cyklu rujowego i okresem wczesnej ciąży; 2/ chemeryna poprzez aktywację/inhibicję szlaków Akt, MAPK/Erk1/2 i AMPK wpływa na regulację funkcji sekrecyjnych komórek przysadki świni.

Pierwsza z publikacji stanowiących rozprawę doktorską ukazała się w czasopiśmie *Animal Reproduction Science*. W pracy tej Doktorantka postawiła sobie za cel (1) ocenę poziomu ekspresji genu chemeryny, na poziomie mRNA i białka, w komórkach przedniego i tylnego płata przysadki w różnych dniach cyklu rujowego i wczesnej ciąży świni, (2) określenie lokalizacji chemeryny w komórkach przedniego płata przysadki, oraz (3) ocenę wpływu chemeryny, w



różnych stężeniach, na podstawową i indukowaną GnRH i/lub insuliną sekrecję LH i FSH przez komórki przedniego płata przysadki. Stosując metody real-time PCR, western blot, barwienie immunofluorescencyjne oraz testy immunoenzymatyczne Doktorantka potwierdziła lokalną produkcję chemeryny w obydwu płatach przysadki świni i wykazała, że jej ekspresja ulega zmianom w różnych dniach cyklu i wczesnej ciąży, co sugeruje wpływ statusu hormonalnego na poziom ekspresji genu dla chemeryny. Ponadto stwierdziła wpływ chemeryny na podstawową i indukowaną sekrecję gonadotropin w zależności od fazy cyklu rujowego, co może wskazywać na pośredni wpływ tej adipokiny na kontrolę układu rozrodczego, przy czym wrażliwość gonadotropów na działanie chemeryny może być różna w zależności od statusu hormonalnego zwierzęcia.

Druga praca będąca częścią rozprawy doktorskiej ukazała się w czasopiśmie naukowym *Theriogenology*, a jej celem była: (1) ocena poziomu ekspresji trzech receptorów dla chemeryny, na poziomie mRNA i białka, w komórkach przedniego i tylnego płata przysadki w różnych dniach cyklu rujowego i wczesnej ciąży świni, (2) lokalizacja receptorów chemeryny w komórkach przedniego płata przysadki, oraz (3) ocena wpływu chemeryny na aktywację/inhibicję szlaków sygnałowych Akt, MAPK/Erk1/2 i AMPK w komórkach przedniego płata przysadki w 10.-12. dniu cyklu rujowego. Doktorantka wykazała, przy zastosowaniu metod real time-PCR, Western blot oraz immunofluorescencji, obecność wszystkich typów receptorów dla chemeryny w obydwu płatach przysadki świni, chociaż poziom ich ekspresji był zależny od statusu hormonalnego zwierzęcia. Wyniki te wskazują, że chemeryna może, za pośrednictwem swoich receptorów, modulować funkcje przysadki, a przez to wpływać na procesy rozrodcze. Ponadto Doktorantka stwierdziła wpływ chemeryny na zaangażowane w sekrecję gonadotropin szlaki sygnałowe (Akt, MAPK/Erk1/2 i AMPK), co wskazuje na potencjalny mechanizm, za pośrednictwem którego adipokina ta może oddziaływać na komórki docelowe.

Powyższe publikacje były już poddane wnikliwej analizie przez redakcje czasopism i recenzentów, a fakt ich opublikowania w prestiżowych czasopismach wskazuje na ich wysoką wartość naukową. Prace stanowią logiczny układ, są napisane zrozumiale i zawierają szczegółowy opis metod, wyników, a także prawidłowo przeprowadzoną dyskusję. Chciałabym jedynie zwrócić uwagę, że lepszą kontrolą negatywną w reakcji immunofluorescencyjnej, od ominięcia przeciwciała pierwszorzędowego, jest zastosowanie nieimmunizowanej surowicy pochodzącej od gatunku zwierzęcia, od którego pochodzi przeciwciało pierwszorzędowe.

Ponadto rozprawa zawiera opracowanie w języku polskim, które rozpoczyna przedstawienie streszczeń, w języku polskim i angielskim, oraz



spis publikacji składających się na rozprawę doktorską. Rozdział kolejny – *Wstęp*, będący syntetycznym przeglądem literatury, stanowi ciekawe wprowadzenie do podjętej w pracy tematyki. Doktorantka zwróciła w nim uwagę na wciąż słabo poznaną rolę chemeryny w rozrodzie, zwłaszcza zwierząt gospodarskich. Rozdział ten napisany jest bardzo rzeczowo i prowadzi do klarownie zdefiniowanego celu pracy i zakresu badań. Bardzo dokładny opis materiału badawczego i stosowanej metodyki badań został zawarty w rozdziale *Materiały i Metody*. Ekspresję systemu chemerynowego badano w czterech okresach cyklu rujowego – fazie wczesnolutealnej, środkowolutealnej, późnolutealnej i pęcherzykowej, oraz w czterech okresach wczesnej ciąży, obejmujących migrację zarodków w macicy, maczyne rozpoznanie ciąży, jak również początek i zakończenie implantacji. Stosowane metody to: analiza real-time PCR, Western blotting, immunofluorescencja, hodowle *in vitro* komórek przedniego płata przysadki, metoda immunoenzymatyczna, oraz analiza statystyczna. W tej części rozprawy zabrakło mi wyjaśnienia dlaczego w badaniach *in vitro* zastosowano dwie dawki chemeryny do oceny jej wpływu na indukowaną GnRH i/lub insuliną sekrecję gonadotropin, i jak odnoszą się one do warunków fizjologicznych. Również chciałabym prosić o komentarz dlaczego do określenia wpływu chemeryny na aktywację szlaków sygnałowych w komórkach przedniego płata przysadki użyto tylko jednej dawki.

W rozdziale „Wyniki” podsumowano w skondensowanej formie wyniki zawarte w dwóch pracach stanowiących rozprawę doktorską. Po przeczytaniu tego rozdziału nasunęły mi się następujące spostrzeżenia i pytania dotyczące pracy:

1. Czy sprawdzano obecność systemu chemerynowego w komórkach laktotropowych?
2. Jaka może być przyczyna braku lokalizacji systemu chemerynowego w komórkach korykotropowych?
3. Nie znalazłam wytłumaczenia odnośnie zastosowanych czasów inkubacji komórek przedniego płata przysadki z chemeryną w eksperymentach *in vitro*, których wyniki przedstawiono w obydwu pracach składających się na rozprawę.
4. Analizując wyniki w wielu przypadkach uderza brak zgodności między poziomem mRNA i białka. Wyjaśnienie tego zjawiska znalazłam w publikacjach, jednak dobrze byłoby, gdyby podobny komentarz znalazł się w opracowaniu.

Polskojęzyczne opracowanie zamyka sześć wniosków oraz wykaz wybranych pozycji piśmiennictwa w liczbie 44. Za najważniejsze osiągnięcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Kisielewskiej uznaję (1) wykazanie, że ekspresja chemeryny i jej receptorów w obydwu płatach przysadki świni ulega zmianom w różnych fazach cyklu i wczesnej ciąży, co sugeruje związek



systemu chemerynowego ze zmiennym statusem hormonalnym, oraz (2) wykazanie wpływu chemeryny na profil sekrecyjny gonadotropin oraz aktywację/inhibicję szlaków sygnałowych Akt, MAPK/Erk1/2 i AMPK w przysadce świni.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kisielewskiej stanowi poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat udziału chemeryny, hormonu wiązanego dotychczas z kontrolą metabolizmu, w regulacji procesów rozrodczych świni na poziomie przysadki mózgowej. Jest to praca pionierska, wartościowa dla nauki, wykazująca ogólną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez nią badań naukowych. Wysoko oceniam wartość merytoryczną badań, ich wykonanie i interpretację. Natomiast poczynione z obowiązku recenzenta drobne uwagi nie wpływają istotnie na jej wartość merytoryczną. Uzyskane wyniki stanowią nie tylko wartość poznawczą, ale również podstawę do dalszych badań, zmierzających do poznania mechanizmów regulujących funkcje wydzielnicze przysadki.

#### WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kisielewskiej: „Wpływ chemeryny na funkcje przysadki świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w cyklu rujowym i wczesnej ciąży” spełnia warunki określone w artykule 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 z późniejszymi zmianami) stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Katarzyny Kisielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie proponuję wyróżnienie recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Kraków 04.07.2022

*Katarzyna Knapczyk-Strora*