



**INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

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

Olsztyn, 18 czerwca 2022 r.

Dr hab. Aneta Andronowska
Zakład Mechanizmów Działania Hormonów
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polska Akademia Nauk
ul. Tuwima 10
10-748 Olsztyn
e-mail: a.andronowska@pan.olsztyn.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Zuzanny Kunickiej

**pt. „ Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów w regulacji syntezy
cytokin w błonie śluzowej macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)**

Ocena strony formalnej

Rozprawa doktorska mgr Zuzanny Kunickiej dotyczy wpływu ligandów PPAR na syntezę cytokin w endometrium świni w cyklu rujowym w środkowej i późnej fazie lutealnej lub w okresie maczynego rozpoznania ciąży oraz początkowym okresie implantacji. Recenzowana praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Bogackiej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 ze zmianami) stanowi ona cykl trzech spójnych tematycznie prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach naukowych w latach 2018-2019. Badania były finansowane w ramach projektu badawczego NCN OPUS9 Nr2015/17/B/NZ9/03596.

1. Kunicka Z, Kurzyńska A, Szydłowska A, Mierzejewski K, Bogacka I. **2018**. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands affect NF-kB and cytokine synthesis in the porcine endometrium – An *in vitro* study. *American Journal of Reproductive Immunology*, e13053, doi:10.1111/aji.13053

2. Kunicka Z, Kurzyńska A, Szydłowska A, Kaczyńska B, Bogacka I. **2019**. PPAR β/δ ligands regulate the expression of immune response mediators in the porcine endometrium – An *in vitro* study. *Theriogenology*, 134: 112-120. Doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.022
3. Kunicka Z, Kurzyńska A, Szydłowska A, Bogacka I. **2019**. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates the expression of the immune response mediators in the porcine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 00:e13211, doi:10.1111/aji.13211

Przedstawione publikacje są opracowaniami zbiorowymi, liczącymi 4-5 współautorów, gdzie we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem. Do każdej publikacji dołączone jest oświadczenie współautorów, wskazujące na znaczący udział Doktoranta w opracowaniu koncepcji oraz metodyki badań, wykonaniu badań i analiz laboratoryjnych, opracowaniu wyników badań oraz przygotowaniu publikacji do druku. Udział pozostałych współautorów, poza Promotorem, ograniczał się do pomocy w wykonaniu badań laboratoryjnych oraz współudziale w opracowaniu koncepcji badań oraz metodyki badań. W związku z tym znaczący wkład Doktorantki w powstanie każdej z prac nie budzi żadnych wątpliwości.

Czasopisma, w których opublikowano w/w artykuły, są anglojęzyczne i znajdują się na liście Journal Citation Report. Współczynnik wpływu (Impact Factor) czasopisma w roku publikacji oraz punktacja wg MEiN z dnia 21 grudnia 2021r, przedstawiają się następująco: American Journal of Reproductive Immunology – IF= 3,091 (2018r), pkt=100 oraz IF=2,739 (2019r), pkt=100, *Theriogenology* - IF=2,094; pkt=140. Sumaryczny IF całego zbioru prac wynosi 7,924, a łączna suma punktów wg MEiN – 340. Wszystkie czasopisma mają renomę i uznanie w dziedzinach nauk rolniczych, biologicznych i weterynaryjnych.

Przedłożone do oceny publikacje są spójne tematycznie i skupiają się wokół wyraźnie wyodrębnionego zagadnienia, dotyczącego roli PPAR w regulacji syntezy cytokin w tkankach układu rozrodczego świni domowej w czasie cyklu rujowego oraz okresie wczesnej ciąży. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest w pełni uzasadniona i jest kontynuacją naukowych zainteresowań Pani Promotor oraz Zespołu badawczego, w którym Doktorantka realizowała badania.

Sukces reprodukcyjny uzależniony jest od wielu czynników, jednak kluczowym etapem jest process implantacji zarodka. Wyjaśnienie/zidentyfikowanie czynników warunkujących prawidłowy przebieg tego procesu wydaje się nadwymiar istotne, zwłaszcza czynników

warunkujących prawidłowe funkcjonowanie układu immunologicznego. PPAR to receptory jądrowe pełniące funkcję czynników transkrypcyjnych. Profil ekspresji PPAR uzależniony jest zarówno od miejsca występowania jak i rodzaju izoformy receptora, tj. jednej z trzech opisanych do tej pory (PPAR: α , β/δ I – γ). Ich funkcja wiązana jest z wieloma fizjologicznymi procesami np. adipogenezą, metabolizmem lipidów, wzrostem i różnicowaniem komórek a także z procesami rozrodczymi. Obecność PPAR stwierdzono w jajniku, macicy, zarodkach, łożysku oraz błonach płodowych. Wykazano, że w jajniku receptory PPAR biorą udział w procesach steroidogenezy, angiogenezy, cyklu komórkowego i apoptozy. Dane literaturowe wskazują także na istotną rolę PPAR w różnicowaniu trofoblastu, w procesie implantacji oraz rozwoju zarodków i tworzeniu doczesnej. Jednakże mało jest danych dotyczących ekspresji PPAR oraz ich roli w tkankach macicy. Dostępne dane literaturowe wskazują na możliwy udział PPAR γ w regulacji aktywności układu immunologicznego w tkankach narządów rozrodczych. Przedłożona do recenzji praca wpisuje się w przedstawione zagadnienia. Ma ona na celu poznanie roli PPAR w regulacji syntezy cytokin w błonie śluzowej macicy świni oraz w modulowaniu procesów immunologicznych w okresie macicznego rozpoznania ciąży. Zatem podejmowane przez Doktorantkę zagadnienie jest aktualne i o dużej wartości poznawczej.

W publikacji opublikowanej w *American Journal of Reproductive Immunology* (2019) Doktorantka określiła wpływ ligandów PPAR na ekspresję NF- κ B, i cytokin (IL-1B, IL-4, IL-6, IL-8, IL-1- oraz LIF w błonie śluzowej macicy świni podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży. Doktorantka wykazała, iż agonista PPAR α WY-14643 obniżał ekspresję mRNA NF- κ B prawie we wszystkich analizowanych okresach z wyjątkiem 10-12 dnia cyklu, ale podwyższał ekspresję białka NF- κ B z wyjątkiem 14-16 dnia ciąży. Ponadto, WY-14643 powodował wzrost ekspresji białka IL-1 β i IL-6, wzrost ekspresji mRNA IL-8 i LIF oraz obniżenie ekspresji IL-4.

W drugiej przedstawionej do recenzji pracy opublikowanej w *Theriogenology* (2018) Doktorantka określiła wpływ wybranych ligandów PPAR β/δ na ekspresję NF- κ B oraz wybranych cytokin: IL-1B, IL-4, IL-6, IL-8, IL-1- oraz LIF w błonie śluzowej macicy świni podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży. Badania wykazały iż agonista PPAR β/δ hamuje ekspresję mRNA NF- κ B we wszystkich analizowanych okresach reprodukcyjnych ale nie wpływa na ekspresję białka. Przeciwnie, antagonistą PPAR β/δ powodował wzrost ekspresji białka NF- κ B w 10-12 dniu cyklu i ciąży. Agonista PPAR β/δ stymulował ekspresję mRNA LIF, IL-1 β i IL-8 a obniżał ekspresję mRNA IL-6.

W kolejnej pracy opublikowanej w *American Journal of Reproductive Immunology* (2018) Doktorantka badała wpływ ligandów PPAR γ na ekspresję NF- κ B, wybranych cytokin oraz LIF w cyklu rujowym i w okresie macicznego rozpoznania ciąży. Uzyskane wyniki wskazują na hamujący wpływ agonistów PPAR na ekspresję mRNA NF- κ B w 14-16 dniu cyklu oraz okresie macicznego rozpoznania ciąży. Ligandy PPAR obniżały koncentrację białka NF- κ B w 14-16 dniu cyklu. Zastosowane w badaniach ligandy PPAR γ w różny sposób oddziaływały na ekspresję mRNA i białek badanych cytokin.

Uzyskane dane wskazują iż receptory PPAR są zaangażowane w regulację ekspresji NF- κ B oraz cytokin w endometrium świni. Ich zróżnicowany wpływ na badane czynniki może być uzależniony od wrażliwości tkanki i statusu reprodukcyjnego.

Lektura powyższych publikacji była dla mnie satysfakcjonująca i nie mam właściwie żadnych uwag merytorycznych. Publikacje opublikowane w recenzowanych czasopismach z listy JCR ułatwiają zadanie recenzentowi. Zarówno strona merytoryczna, jak i wartość naukowa uzyskanych wyników została poddana wnikliwej ocenie oraz potwierdzona przez Recenzentów i Edytorów czasopism, którzy zaakceptowali prace do druku. Prace stanowią logiczny układ, są napisane zrozumiale z jasno postawionymi celami, szczegółowym opisem metod oraz wyników, a także prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. Dane przedstawione w przedstawionych publikacjach mają charakter nowatorski. Wartość poznawcza wyników otrzymanych przez Panią mgr Zuzannę Kunicką oceniam wysoko, co potwierdza fakt opublikowania publikacji w czasopismach o tematyce obejmującej fizjologię i immunologię rozrodu.

Integralną częścią rozprawy, oprócz kopii publikacji, jest zwarte, 35 stronicowe polskojęzyczne opracowanie, napisane na wzór tradycyjnych dysertacji, zawierające następujące rozdziały: Streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, Wstęp, Hipotezy Badawcze i Cele Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Podsumowanie i Wnioski oraz Piśmiennictwo.

We *Wstępie* opracowania w języku polskim, na 7 stronach, doktorantka przedstawia podstawowe dane dotyczące implantacji zarodka. Podaje charakterystykę cytokin ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w fizjologii macicy w cyklu rujowym oraz w okresie wczesnej ciąży. Następnie charakteryzuje budowę receptorów jądrowych PPAR oraz ich funkcje jakie pełnią w organizmie zwierząt i człowieka, również rolę w procesach rozrodczych. Opis został wzbogacony ryciną (Rys. 1.) przedstawiającą schemat aktywacji receptorów PPAR. Celem pracy podjętej przez Doktorantkę było wykazanie, że izoformy:

PPAR α , - β/δ oraz γ uczestniczą w regulacji syntezy cytokin w błonie śluzowej macicy świni w czasie cyklu rujowego (w dniach 10-12 i 14-16) oraz wczesnej ciąży (dni 10-12 i 14-16). W rozdziale *Hipotezy badawcze i cele pracy* Doktorantka formułuje hipotezę badawczą oraz określa trzy zadania badawcze w celu jej weryfikacji. Rozdział *Materiały i Metody* stanowi syntetyczny opis stosowanych metod badawczych i procedur. W rozdziale *Wyniki* opisano w skondensowanej formie uzyskane wyniki zawarte w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską. Rozdział ten podzielony został na podrozdziały, z których każdy dotyczył osobnej pracy badawczej. Polskojęzyczne opracowanie zamyka jednostronicowe *Podsumowanie* oraz 4 tabele w których zestawione zostały uzyskane wyniki badań. W rozdziale *Wnioski* Doktorantka formułuje dwa wnioski. Wnioski są poprawne i odzwierciedlają uzyskane wyniki.

Po przeczytaniu pracy nasuwają mi się następujące pytania:

1. Czy wiadomym jest jaka jest komórkowa lokalizacja poszczególnych izoform PPAR w błonie śluzowej macicy świni.
2. Jaka jest funkcja PPAR w błonie mięśniowej macicy?

Przedstawione przeze mnie pytania nie umniejszają wartości merytorycznej pracy i wynikają jedynie z ciekawości oraz obowiązku recenzenta

Za najważniejsze osiągnięcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Zuzanny Kunickiej uważam stwierdzenie iż: 1/ zastosowane ligandy wszystkich izoform PPAR hamowały ekspresję mRNA jądrowego czynnika NF- κ B, natomiast stymulowały ekspresję przeciwwzapalnej cytokiny LIF w późnej fazie lutealnej oraz w okresie maczynego rozpoznania ciąży, 2/ w badanych okresach ciąży, ligandy wszystkich izoform PPAR stymulowały ekspresję białka IL-1 β , 3/ aktywacja różnych izoform PPAR hamowała ekspresję mRNA IL-8 we wszystkich badanych okresach z wyjątkiem okresu maczynego rozpoznania ciąży.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr Zuzanny Kunickiej oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona oryginalne opracowanie naukowe, wykazuje ogólną wiedzę Doktorantki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Biorąc pod uwagę ilość analizowanych czynników można stwierdzić iż Doktorantka zrealizowała wszystkie postawione cele/zadania. Otrzymane przez Doktorantkę wyniki są wartościowe i poszerzają dotychczasową wiedzę na temat roli receptorów jądrowych PPAR w błonie śluzowej macicy świni domowej. Pojawiające się w opracowaniu polskojęzycznym niefortunne sformułowania jak np. hamowanie koncentracji białka nie umniejszają w żaden sposób wartości

merytorycznej pracy która zawiera cenne naukowe wyniki a opublikowanie wyników w 3 oryginalnych pracach jest osiągnięciem zasługującym na słowa uznania.

Wnioski końcowe

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny Rozprawa doktorska Pani mgr Zuzanny Kunickiej, stanowiąca spójny tematycznie cykl trzech oryginalnych publikacji pod wspólnym tytułem „Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów w regulacji syntezy cytokin w błonie śluzowej macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)” jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego i dowodem, iż doktorantka opanowała znaczący zakres wiedzy naukowej. Przedstawiona do oceny rozprawa wnosi istotne elementy do nauki i spełnia wszystkie warunki określone w art. 13, Ustawy z dnia 13 marca 2013 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, póź.zm.), a dorobek doktorantki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biologia. W związku z tym, wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o dopuszczenie Pani mgr Zuzannę Kunicką do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na uzyskanie wyników badań wnoszących istotny wkład w naukę, czego dowodem jest opublikowanie prac stanowiących rozprawę doktorską w bardzo dobrych czasopismach wnioskuję o wyróżnienie dysertacji.

Andronowosha Hueta