

Kraków, 1 września 2022 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

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Edyty Rytelewskiej pt.
" Rola chemeryny w jajniku świni domowej
(*Sus scrofa domestica* L.)"**

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Edyty Rytelewskiej została wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem prof. dr hab. Niny Smolińskiej - promotora oraz dr Marty Kieżun - promotora pomocniczego. Badania zrealizowano w ramach dwóch projektów badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki: OPUS 9 (nr 2015/17/B/NZ9/03595) oraz PRELUDIUM 14 (nr 2017/27/N/NZ9/00638), których kierownikami były odpowiednio Pani Promotor oraz Doktorantka.

Dysertacja obejmuje cykl trzech prac naukowych opublikowanych w latach 2020 i 2021 w renomowanych czasopismach z zakresu biologii rozrodu, indeksowanych w bazie JCR (*Journal Citation Reports*), tj. *Molecular Reproduction and Development* (IF=2,609; punkty MEiN=100), *Theriogenology* (IF=2,74; punkty MEiN=140) oraz *Biology of Reproduction* (IF=4,285; punkty MEiN=200). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF, *imapct factor*) czasopism jest wysoki i wynosi 9,634, natomiast suma punktów MEiN to 440 (wg komunikatu MEiN w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 21 grudnia 2021 roku). We wszystkich przedłożonych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a dodatkowo w jednej jest również autorem korespondencyjnym. Publikacje są wieloautorskie (odpowiednio dziesięciu i ośmiu autorów), jednak z dołączonych do rozprawy doktorskiej oświadczeń współautorów wynika, że Pani mgr Edyta Rytelewska brała udział w opracowaniu koncepcji oraz metodyki badań, przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, analizie i zarządzaniu danymi, opracowaniu i walidacji wyników, przygotowaniu manuskryptu i udzielaniu odpowiedzi recenzentom. Warto podkreślić także Jej skuteczność w pozyskiwaniu środków na badania w

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: +48 12 664 50 98

postaci projektu PRELUDIUM 14. Uważam, że wkład Doktorantki w powstanie publikacji stanowiących podstawę Jej dysertacji jest wystarczający i nie budzi zastrzeżeń.

Jajnik ssaków odpowiada za produkcję komórek rozrodczych oraz za syntezę hormonów steroidowych. Jego funkcjonowanie jest regulowane przez przysadkowe gonadotropiny, steroidy oraz lokalnie produkowane czynniki, których działanie jest zależne od stanu fizjologicznego samicy (faza cyklu rujowego, ciąża). Chemeryna jest hormonem modulującym odpowiedź immunologiczną organizmu oraz jego homeostazę energetyczną, dzięki czemu zaliczana jest zarówno do cytokin i adipokin. Badania ostatnich lat wskazują, że chemeryna może być lokalnie syntetyzowana w jajniku ssaków, a oddziałując poprzez swoje receptory CMKLR1, GPR1 i CCRL2 może wywierać bezpośredni wpływ na komórki jajnika, co pozwala zakładać jej istotny udział w regulacji funkcji gonady żeńskiej. Dotychczasowe doniesienia na temat ekspresji poszczególnych elementów sytemu chemerynowego w jajniku ludzi i zwierząt oraz kompleksowej roli chemeryny w regulowaniu jego funkcjonowania są jedynie fragmentaryczne. Co więcej, brak jest takich informacji w odniesieniu do zwierząt gospodarskich, w tym świni domowej, u których zaburzenia homeostazy energetycznej mogą negatywnie wpływać na potencjał rozrodczy. W związku z tym, poszerzenie aktualnego stanu wiedzy na ten temat oraz wyjaśnienie wpływu chemeryny na podstawowe procesy zachodzące w jajniku świni, tj. steroidogeneza, angiogeneza i apoptoza, czego podjęła się Doktorantka w przedłożonej mi do recenzji pracy doktorskiej, należy uznać za szczególnie istotne i zasadne. Podjęta tematyka doskonale wpisuje się w nurt badań prowadzonych przez zespół badawczy prof. Niny Smolińskiej i konsekwentnie stanowi ich kontynuację. Doktorantka postawiła hipotezę badawczą zakładającą udział chemeryny w regulacji funkcjonowania jajników świni domowej i zweryfikowała ją wykonując szereg dobrze zaplanowanych doświadczeń oraz wykorzystując podstawowe metody badawcze tj. analiza Western blot, real-time PCR, immunofluorescencja, metoda radioimmunologiczna oraz immunoenzymatyczna oraz hodowle komórkowe. Badania przeprowadzono na modelu świni domowej *Sus scrofa domestica* L., która wykazuje podobieństwo anatomiczne i fizjologiczne do człowieka, a dodatkowo jest ważnym gatunkiem gospodarskim. Stwierdzam, że podjęta tematyka badawcza jest wartościowa, a uzyskanie kompleksowych wyników badań może przyczynić się nie tylko do pełniejszego zrozumienia roli chemeryny w funkcjonowaniu jajnika świni, ale także może zostać wykorzystane w optymalizacji rozrodu świń, a tym samym zwiększaniu efektywności produkcji trzody chlewnej.

OMÓWIENIE PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

W pierwszej publikacji wchodzącej w skład dysertacji, Doktorantka wykazała obecność transkryptu oraz białka dla chemeryny i jej receptorów CMKLR1, GPR1 i CCRL2 w pęcherzykach jajnikowych świń niedojrzałych oraz dojrzałych płciowo, a także w ciałkach żółtych świń będących w cyklu rujowym lub we wczesnej ciąży. Ponadto przedstawiono szczegółową lokalizację chemeryny oraz jej receptorów we wszystkich badanych strukturach jajnikach świni w różnych stanach fizjologicznych, a także zawartość chemeryny w płynie pęcherzykowym zwierząt niedojrzałych i dojrzałych płciowo. Wykazano, że ekspresja transkryptów i białek elementów systemu chemerynowego zależna jest od etapu rozwoju pęcherzyka jajnikowego lub fazy cyklu rujowego/etapu wczesnej ciąży w przypadku ciałek żółtych, co wynika prawdopodobnie z różnego statusu hormonalnego tych zwierząt. Należy podkreślić, że są pierwsze tak kompleksowe badania dotyczące obecności układu chemerynowego w jajniku.

Celem drugiej pracy było zbadanie wpływu dwóch dawek chemeryny na podstawową oraz stymulowaną (przez LH/FSH i/lub insulinę) sekrecję hormonów steroidowych (progesteronu, androstendionu, testosteronu, estronu i estradiolu) przez komórki ziarniste i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego świni oraz komórki lutealne izolowane podczas cyklu rujowego i we wczesnej ciąży. Uzyskane wyniki wykazały zmiany w koncentracji hormonów steroidowych w pożywce hodowlanej pochodzącej z hodowli *in vitro* wymienionych typów komórek jajnika, wskazując jej wpływ zarówno na podstawowe oraz stymulowane wydzielanie steroidów.

Trzecia publikacja stanowiąca cykl rozprawy doktorskiej przedstawia wpływ dwóch dawek chemeryny na koncentrację czynników angiogennych (VEGF-A i bFGF) w pożywce z hodowli *in vitro* komórek lutealnych świni izolowanych z ciałek żółtych wczesnej, środkowej i późnej fazy lutealnej, a także ekspresję białek dla receptorów VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR1 i FGFR2. Zaobserwowano stymulujący wpływ chemeryny na sekrecję obu czynników angiogennych oraz na ekspresję ich receptorów we wszystkich fazach cyklu rujowego. Drugi nurt tej pracy dotyczy wpływu chemeryny na proces apoptozy w komórkach lutealnych świni. W tym celu badano ekspresję białek Fas i FasL, Bcl-2, BAX i kaspazy 3 podczas cyklu rujowego w hodowanych *in vitro* komórkach lutealnych oraz wykazano modulujący wpływ chemeryny zależny od fazy cyklu rujowego.

Lektura powyższych publikacji była dla mnie satysfakcjonująca i nie znalazłam w nich elementów problematycznych. Zarówno strona

merytoryczna, jak i wartość naukowa uzyskanych wyników zostały poddane wnikliwej ocenie przez Recenzentów i Edytorów czasopism, którzy zaakceptowali prace do druku. Prace stanowią logiczny i spójny układ, są napisane zrozumiale, z jasno postawionymi celami, szczegółowym opisem metod analitycznych oraz wyników, a także prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. Uzyskane rezultaty mają charakter nowatorski, a wartość poznawczą wyników otrzymanych przez Panią mgr Rytelewską oceniam wysoko.

OMÓWIENIE OPRACOWANIA W JĘZYKU POLSKIM

Publikacjom wchodzącym w skład dysertacji Pani mgr Edyty Rytelewskiej towarzyszy opracowanie w języku polskim. Obejmuje ono 47 stron i zawiera: streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp, uzasadnienie wyboru modelu badawczego, hipotezę oraz zadania badawcze, materiał i metody badawcze, wyniki, podsumowanie uzyskanych wyników i wnioski. Do publikacji dołączono również oświadczenia współautorów prac, z których wynika wiodący udział Doktorantki w omawianych publikacjach. Na końcu opracowania znajduje się bibliografia obejmująca 57 cytacji. Muszę podkreślić, że ta część pracy została przygotowana z niezwykłą dbałością o szczegóły, starannie, estetycznie i wzorowo pod względem merytorycznym, językowym i edytorskim. Świadczy to o ogromnej pracy, jaką Doktorantka włożyła w jej przygotowanie, bardzo dobrej umiejętności przekazu zawartych w niej treści oraz zdolności poprawnego posługiwania się językiem polskim.

We *Wstępie* Doktorantka scharakteryzowała chemerynę i jej receptory, wyjaśniła jej podstawowe działanie w organizmie na układ immunologiczny oraz utrzymanie równowagi energetycznej, a także przedstawiła dotychczas znaną ekspresję systemu chemerynowego w jajniku ssaków oraz zaangażowanie chemeryny w regulację procesów steroidogenezy, angiogenezy i apoptozy, uzasadniając tym samym cel pracy. Rozdział jest napisany czytelnie i przejrzysto, co potwierdza dobre zapoznanie się Doktorantki z tematyką prowadzonych badań. Dodatkowo przekonująco uzasadniono wybór modelu badawczego, podkreślając jego użyteczność w badaniach biomedycznych oraz podobieństwo do człowieka pod względem anatomicznym, fizjologicznym i metabolicznym. W mojej opinii ta część pracy jest napisana bardzo dobrze pod względem językowym i edytorskim, uniemożliwiając tym samym recenzentowi wskazanie jakichkolwiek niedociągnięć.

W dalszej części opracowania polskojęzycznego znajdują się jasno i poprawnie sformułowane hipotezy badawcze oraz cele pracy, które zostały

zrealizowane dzięki odpowiednio zaplanowanym doświadczeniom opisanym w rozdziale *Metody badawcze*. Materiał badawczy stanowiły pęcherzyki jajnikowe niedojrzałych i dojrzałych płciowo świń oraz ciała żółte pochodzące z poszczególnych faz cyklu rujowego oraz z okresu wczesnej ciąży. Uważam, że ze względu na dużą różnorodność badanych struktur jajnika, różny stan fizjologiczny zwierząt oraz zróżnicowanie wykonanych analiz, znacznym ułatwieniem w podążaniu za kolejnymi zadaniami badawczymi byłoby przygotowanie obrazującego je schematu. Poszczególne metody badawcze zostały przedstawione bardzo szczegółowo, co pozwala sądzić, iż wynika to samodzielnego ich wykorzystania przez Doktorantkę. Mam jednak kilka uwag i wątpliwości dotyczących badania ekspresji genów metodą real-time PCR:

1. Z opracowania polskojęzycznego oraz publikacji 1 wynika, że wykorzystano inne geny referencyjne do analizy ekspresji genów w całych pęcherzykach jajnikowych, a inne w komórkach ziarnistych, osłonki wewnętrznej i ciała żółtego. Czy można zatem porównywać obserwowany poziom ekspresji? Z czego wynika takie podejście?
2. W opracowaniu polskojęzycznym wskazano, że geny *UBC* i *RNA18S* zostały wybrane na podstawie prac Martyniaka i in. (2017, 2018). Prace te zostały wykonane na jajowodzie świni, a zatem czy Doktorantka przeprowadziła walidację wybranych genów na badanych przez nią tkankach? Jakiego programu zostały wykorzystane do wykonania walidacji?
3. Dlaczego do obliczenia względnych poziomów ekspresji badanych genów wykorzystano dwie różne metody wg *Pfaffla (2001)* i *Livaka i Schmittgena (2001)*?

W rozdziale *Wyniki* w sposób skondensowany i klarowny przedstawiono uzyskane rezultaty. Treść rozdziału jest zgodna z zawartością publikacji stanowiących podstawę dysertacji i w adekwatny sposób odnosi się do poszczególnych rycin i tabel w nich zawartych. Kontynuacją tego rozdziału jest kolejny - *Podsumowanie uzyskanych wyników i wnioski*, w którym przedstawiono analizę otrzymanych wyników, zakończoną jednym ogólnym wnioskiem mówiącym, że chemeryna jest ważnym czynnikiem regulującym funkcjonowanie jajnika świni. Potwierdza to skuteczną realizację założonych celów pracy.

Po przeczytaniu omówienia polskojęzycznego oraz cyklu publikacji nasunęły mi się następujące pytania i uwagi:

1. Wskazując na zależność ekspresji chemeryny i jej receptorów w pęcherzykach jajnikowych oraz ciała żółtym świni od statusu fizjologicznego zwierząt (fazy cyklu rujowego, ciąży), który jest związany ze zmianami w poziomie steroidów, warto byłoby zbadać wpływ estradiolu i progesteronu na ekspresję elementów systemu chemerynowego w jajniku świni.
2. Doktorantka wnioskuje, że chemeryna może regulować wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych (strona 43). Nie wynika to bezpośrednio z przeprowadzonych analiz, dlatego chciałbym prosić o zaproponowanie doświadczeń, które mogłyby potwierdzić te przypuszczenia.
3. Publikacja 2 przedstawia wpływ chemeryny na sekrecję steroidów przez komórki ziarniste i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego oraz komórki lutealne ciała żółtego świni. Doskonałym uzupełnieniem zaprezentowanych wyników byłoby zbadanie aktywności enzymów szlaku steroidogenezy i/lub ekspresji ich białek. Czy Doktorantka rozważała przeprowadzenie takich analiz w swojej pracy?
4. Na stronie 39 Doktorantka pisze, że chemeryna wpływa na proces angiogenezy w ciałkach żółtych świni. Uważam to stwierdzenie za zbyt śmiałe, gdyż nie badano funkcjonalnej angiogenezy, a jedynie koncentrację czynników angiogennych oraz ich receptorów.
5. W publikacji 3 badano wpływ chemeryny na proces apoptozy. Zabrakło mi jednak analizy aktywności efektorowej kaspazy 3 oraz incjatorowych kaspaz 8 i 9, która jednoznacznie wskazałaby czy proces apoptozy jest aktywowany i którym szlakiem on przebiega.

PODSUMOWANIE

Rozprawę doktorską Pani mgr Edyty Rytelewskiej oceniam wysoko i uważam ją za wartościowe osiągnięcie naukowe, które stanowi istotny wkład w poszerzenie aktualnego stanu wiedzy na temat wpływu chemeryny na funkcje jajnika. Mam ogromną nadzieję, że obserwacje Doktorantki będą kontynuowane i uzupełnione o bardziej szczegółowe i mechanistyczne badania w trakcie dalszych prac prowadzonych przez Zespół. W przedstawionej ocenie skupiłam się na formalnej stronie rozprawy, z uwzględnieniem merytorycznej i technicznej jakości prowadzonych badań. Wszystkie te aspekty pracy oceniam

pozytywnie, a moje uwagi zawarte w przedłożonej recenzji nie umniejszają jej wartości merytorycznej.

Za najważniejsze osiągnięcia dysertacji uznaję: (1) wykazanie po raz pierwszy ekspresji mRNA i białka oraz szczegółowej lokalizacji chemeryny i jej receptorów CMKLR1, GPR1 i CCRL2 w pęcherzykach jajnikowych niedojrzałych i dojrzałych płciowo świń oraz ciałkach żółtych z cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży, co świadczy o lokalnej syntezie chemeryny i jej możliwym bezpośrednim działaniu na komórki jajnika w różnych stanach fizjologicznych; (2) wykazanie zróżnicowanego wpływu chemeryny na podstawową oraz stymulowaną sekrecję hormonów steroidowych przez komórki pęcherzyka jajnikowego oraz ciała żółtego świni; (3) wykazanie wpływu chemeryny na ekspresję białek związanych z angiogenezą (VEGF-A i bFGF oraz ich receptorów VEGFR1, VEGFR2 i VEGFR3) i apoptozą (Fas, FasL, Bcl-2, BAX i kaspaza 3) w komórkach lutealnych świni w zależności od fazy cyklu rujowego.

WNIOSEK KOŃCOWY

Z pełnym przekonaniem uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Edyty Rytelewskiej pt. "Rola chemeryny w jajniku świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)" 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 2016 r. poz. 882 z późn. zm.) stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym **zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Edyty Rytelewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Z uwagi na opublikowanie uzyskanych wyników w renomowanych czasopismach naukowych z zakresu biologii rozrodu, ich wysoki poziom naukowy oraz wzorowe przygotowanie opracowania polskojęzycznego, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Ghes'ia