



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

Olsztyn, 28.08.2022

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

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Edyty Rytelewskiej zatytułowana "Rola chemeryny w jajniku świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)" została wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod opieką Promotora naukowego Pani prof. dr hab. Niny Smolińskiej oraz Promotora pomocniczego Pani dr Marty Kieżun.

Na ocenianą rozprawę doktorską składa się polskojęzyczne opracowania w formie manuskryptu oraz trzy prace oryginalne, opublikowane w języku angielskim, wszystkie w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR), które ukazały się w 2020 i 2021 roku. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską:

1. **Rytelewska E.**, Kisielewska K., Kieżun M., Dobrzyń K., Gudelska M., Rak A., Dupont J., Kamińska B., Kamiński T., Smolińska N. 2020. Expression of chemerin and its receptors in the ovaries of prepubertal and mature gilts. Molecular Reproduction and Development 87: 739–762 (IF- 2,609; pkt. MEiN = 100)

2. **Rytelewska E.**, Kieżun M., Kisielewska K., Gudelska M., Dobrzyń K., Kamińska B., Kamiński T., Smolińska N. 2021. Chemerin as a modulator of ovarian steroidogenesis in pigs: an *in vitro* study. Theriogenology 160: 95–101 (IF- 2,74; pkt. MEiN = 140)

3. **Rytelewska E.**, Kieżun M., Zaobidna E., Gudelska M., Kisielewska K., Dobrzyń K., Kamiński T., Smolińska N. 2021. Chemerin as a modulator of angiogenesis and apoptosis processes in the corpus luteum of pigs: an *in vitro* study. Biology of Reproduction 105(4): 1002–1015 (IF- 4,285; pkt. MEiN = 200)

Łączny współczynnik oddziaływania (IF) czasopism, w których opublikowano prace będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora wynosi 9,364, a suma punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki to 440.

W zgłoszonych do rozprawy doktorskiej publikacjach Pani mgr Edyta Rytelewska jest pierwszym autorem, w tym w jednej z nich jest również autorem korespondencyjnym. Przedstawione publikacje są wieloautorskie, liczą od ośmiu do dziesięciu autorów, co jest zrozumiałe w świetle złożonej tematyki, ilości wyników oraz ich szczegółowego opracowania. Do każdej publikacji Autorka dołączyła podpisane indywidualnie oświadczenia wszystkich współautorów prac, którzy szczegółowo określili zakres swojego zaangażowania w wykonywanie badań i przygotowanie poszczególnych publikacji. Treść tych



oświadczeń, jednoznacznie podkreśla bardzo duży wkład Doktorantki w opracowanie koncepcji oraz metodyki badań, przeprowadzenie badań laboratoryjnych, analizę i zarządzanie danymi, opracowanie i walidacji wyników, przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu i udzielenie odpowiedzi recenzentom podczas procesu publikacyjnego. Należy podkreślić również udział Doktorantki w pozyskiwaniu środków na badania, co miało miejsce w przypadku pracy opublikowanej w *Biology of Reproduction*, która powstała w ramach projektu PRELUDIUM 14. W związku z tym, znaczący wkład Doktorantki w powstanie każdej z prac nie budzi wątpliwości.

Integralną częścią rozprawy doktorskiej jest polskojęzyczne opracowanie przygotowane w formie manuskryptu. Zawiera ono: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp będący syntetycznym przeglądem literatury, uzasadnienie wyboru modelu badawczego, hipotezy oraz zadania badawcze, materiał i metody badawcze, wyniki, podsumowanie i wnioski, kopie publikacji wraz z oświadczeniami współautorów oraz wykaz wybranych pozycji bibliografii. Należy podkreślić, że badania do pracy doktorskiej były realizowane w ramach projektów badawczych OPUS 9 (nr 2015/17/B/NZ9/03595) oraz PRELUDIUM 14 (nr 2017/27/N/NZ9/00638) ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Tematem prezentowanej pracy doktorskiej jest wyjaśnienie udziału chemeryny w regulacji funkcji jajnika świni domowej w czasie cyklu i wczesnej ciąży. Podjęta tematyka badawcza jest w pełni uzasadniona i wpisuje się w naukowe zainteresowania Zespołu badawczego, w którym Doktorantka realizowała badania do pracy doktorskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska w rzetelny i ciekawy sposób przedstawia i systematyzuje ogrom informacji dotyczących chemeryny, kolejnej adipokiny, będącej w ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań. Chemeryna ma wielokierunkowe działanie, zaangażowana jest w modulację odpowiedzi immunologicznej, wykazuje silne właściwości prozapalne, nasila insulinooporność, a także bierze udział w regulacji homeostazy energetycznej, głównie przez modulację metabolizmu węglowodanów czy lipidów. Najnowsze badania wskazują na możliwy udział tej adipokiny w kontroli układu rozrodczego samicy. Jednak jej rola oraz mechanizm działania w regulacji tych procesów na poziomie jajnika, nie są w pełni wyjaśnione. Właściwe funkcjonowanie jajników warunkuje prawidłowy przebieg cyklu oraz zapoczątkowanie i utrzymanie ciąży, dlatego też, określenie wpływu chemeryny na jajnik oraz wybrane procesy zaangażowane w regulację funkcji tego narządu, których podjęła się Doktorantka należy uznać za nowatorskie i ważne. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Edyty Rytelewskiej wpisuje się w przedstawione zagadnienia. Ma ona na celu pełniejsze poznanie roli chemeryny w regulacji procesów rozrodczych świni. Zagadnienia poruszane przez Doktorantkę są aktualne i godne uwagi.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr Edyty Rytelewskiej zostały już pozytywnie ocenione przez kompetentnych recenzentów powołanych przez redakcje czasopism

MR



naukowych oraz edytorów czasopism, w których zostały opublikowane, dlatego oceniam je w aspekcie poznawczym i jako wkład w rozwój dyscypliny naukowej.

W pierwszej publikacji, opublikowanej w *Molecular Reproduction and Development*, Pani mgr Edyta Rytelewska podjęła się: (1) określenia profilu ekspresji genów i białek chemeryny oraz jej receptorów (CMKLR1, GPR1, CCRL2) w pęcherzykach jajnikowych świń niedojrzałych płciowo oraz w komórkach ziarnistych, komórkach osłonki wewnętrznej i ciałkach żółtych świń podczas wybranych etapów cyklu rujowego (faza wczesnolutealna, środkowolutealna, późnolutealna i pęcherzykowa) oraz wczesnej ciąży (okres migracji zarodków w macicy, okres maczynego rozpoznania ciąży, początek implantacji i zakończenie implantacji); (2) oceny lokalizacji białek systemu chemerynowego w jajnikach świń niedojrzałych i dojrzałych płciowo; (3) zbadania koncentracji chemeryny w płynie pęcherzykowym u tych zwierząt. Uzyskane wyniki wykazały, że chemeryna jest produkowana lokalnie w jajnikach świń oraz, że hormon ten bezpośrednio wpływa na funkcjonowanie komórek jajników, co potwierdza obecność receptorów chemeryny we wszystkich badanych strukturach jajnika. Stwierdzono również, że ekspresja genów i białek chemeryny oraz jej receptorów zależy od typu komórek, dojrzałości płciowej zwierząt oraz fazy cyklu rujowego i/lub okresu wczesnej ciąży. Ponadto, wykazano, że stężenie chemeryny w płynie pęcherzykowym świń zmienia się w zależności od stanu fizjologicznego zwierząt. Uzyskane wyniki sugerują, że chemeryna może być ważnym czynnikiem regulującym czynność jajników świni. Na podkreślenie zasługuje fakt, że jest to pierwsza dostępna w literaturze kompleksowa identyfikacja ekspresji chemeryny i jej receptorów w jajniku świni.

W drugiej pracy, opublikowanej w *Theriogenology*, Doktorantka wykazała, że w warunkach *in vitro* chemeryna zmienia podstawową i regulowaną hormonem luteinizującym (LH), hormonem folikulotropowym (FSH) i/lub insuliną sekrecję hormonów steroidowych, w tym progesteronu, androstendionu, testosteronu, estronu i estradiolu, przez komórki ziarniste i komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego oraz komórki lutealne świń w różnych okresach statusu reprodukcyjnego. Wyniki wskazują, że chemeryna w zależności od fazy cyklu rujowego i/lub okresu wczesnej ciąży stymuluje lub hamuje wydzielanie hormonów steroidowych przez komórki jajnika i tą drogą może wpływać na funkcje rozrodcze. Uzyskane dane poszerzają wiedzę o możliwym wpływie chemeryny na proces steroidogenezy w jajniku świni.

Kolejna praca, która ukazała się w *Biology of Reproduction*, miała na celu określenie wpływu chemeryny w warunkach *in vitro* na proces angiogenezy i apoptozy w komórkach lutealnych ciałka żółtego świń w cyklu rujowym (faza wczesnolutealna, środkowolutealna i późnolutealna). Doktorantka stosując testy immunoenzymatyczne i analizy western blot, wykazała że chemeryna stymuluje sekrecję głównych czynników angiogennych tj. czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGF-A) oraz zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) przez komórki lutealne oraz zwiększa koncentrację białek receptorów dla czynników angiogennych (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR1, FGFR2) w tych komórkach. Ponadto, Doktorantka stwierdziła, że chemeryna reguluje, w zależności od fazy cyklu rujowego, koncentrację białek czynników zaangażowanych w proces apoptozy, w tym białka Fas i ligandu



receptora Fas oraz białka Bcl-2, a także zmniejsza koncentrację kaspazy-3 w komórkach lutealnych świń. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wskazuje, że chemeryna modulując ilość białek dla czynników zaangażowanych w regulację angiogenezy i apoptozy, wpływa na te procesy w jajnikach świni domowej.

Powyższe publikacje są spójne tematycznie i stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego wyjaśnienia obecności i roli systemu chemerynowego w jajniku 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 bardzo wysoka, o czym świadczy fakt ich opublikowania w renomowanych czasopismach naukowych o tematyce obejmującej fizjologię i endokrynologię rozrodo. 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 jest klarowna. Chciałabym jedynie zwrócić uwagę na brak analiz funkcjonalnych (np. oznaczenia aktywności kaspazy, pomiar enzymów steroidogenezy, analiza struktur kapilaropodobnych), które potwierdziłyby jednoznacznie zaangażowanie chemeryny w procesy steroidogenezy, angiogenezy oraz apoptozy i wzbogaciły uzyskane wyniki.

Jak wspomniano, poza dołączonymi publikacjami, w skład rozprawy doktorskiej wchodzi polskojęzyczne 47-stronicowe opracowanie zawierające zwięzły i precyzyjny opis wykonanych badań. Chciałabym podkreślić, że zarówno pod względem merytorycznym jak i edytorskim, opracowanie to jest przygotowane bardzo starannie, skrupulatnie i czytelnie. Nie mam żadnych zastrzeżeń do strony edytorskiej rozprawy.

Przygotowane opracowanie jest przejrzystym połączeniem trzech prac składających się na rozprawę doktorską. We *Wstępie* Doktorantka wyczerpująco przedstawiła dotychczasowy stan wiedzy w zakresie omawianego zagadnienia oraz wyjaśniła wybór modelu badawczego. Ponadto, szczegółowo omówiła strukturę i syntezę chemeryny, budowę i lokalizację jej receptorów oraz rolę systemu chemerynowego w regulacji wybranych procesów biologicznych, w tym procesów rozrodczych. Doktorantka zwróciła uwagę na brak danych dotyczących roli chemeryny w funkcjonowaniu jajników świni domowej oraz nieliczne dane dotyczące możliwego udziału tej adipokiny w regulacji procesów steroidogenezy, angiogenezy i apoptozy w jajnikach ssaków. Rozdział ten jest napisany dojrzałe i doskonale prowadzi do postawionych hipotez badawczych oraz celu pracy, co świadczy o pełnym zrozumieniu tematu przez Doktorantkę. *Cele pracy* oraz *Hipotezy badawcze* zostały jasno i poprawnie sformułowane. Wyróżnionych zostało sześć szczegółowych zadań badawczych, które następnie były konsekwentnie realizowane. Bardzo dokładnie opisano *Materiał badawczy* wykorzystany w doświadczeniach oraz zastosowane *Metody badawcze*. Należy podkreślić różnorodność wykonanych analiz, co świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę żmudnego warsztatu badawczego. Stosowane



metody to: hodowle *in vitro*: komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej pęcherzyków jajnikowych, komórek lutealnych ciała żółtego, analiza ekspresji genów metodą real-time PCR, analiza ekspresji białek metodą western blot, barwienia immunofluorescencyjne, analizy immunoenzymatyczne oraz radioimmunologiczne do oznaczenia koncentracji hormonów oraz analizy statystyczne. Zaplanowane w badaniach analizy są właściwie dobrane i umożliwiły realizację założonych celów badawczych. Poprawne są również analizy statystyczne przeprowadzone przy opracowaniu uzyskanych wyników. Całość zaplanowanych i wykonanych analiz świadczy o kompetencji metodologicznej Doktorantki oraz Jej przygotowaniu do planowania i wykonywania następnych prac eksperymentalnych.

W rozdziale *Wyniki* opisano w skondensowanej formie najważniejsze wyniki zawarte w pracach stanowiących rozprawę doktorską. Rozdział ten podzielono na podrozdziały, z których każdy dotyczył osobnego zadania badawczego, co przy dużej liczbie uzyskanych danych ułatwiło czytanie i interpretację wyników. Polskojęzyczne opracowanie zamyka *Podsumowanie* oraz główne *Wnioski*, które w jednoznaczny sposób pokazują na zrealizowanie postawionych celów pracy i stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę na temat roli chemeryny w regulacji funkcji jajnika świni domowej. *Wnioski* są poprawne i wynikają z otrzymanych rezultatów. Rozdział *Bibliografia* obejmuje 57 pozycji ułożonych alfabetycznie pozycji piśmiennictwa.

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

1. Proszę wyjaśnić, dlaczego w publikacji nr 1., w analizie względnej ekspresji genów zastosowano różne geny referencyjne: geny cyklofilina A i rybosomalne białko L19 do analiz ekspresji w pęcherzykach jajnikowych, zaś geny: ubikwityny C oraz sekwencję kodującą RNA małej podjednostki rybosomu – 18sRNA do analiz ekspresji w komórkach ziarnistych, osłonki wewnętrznej oraz ciałkach żółtych?
2. Czy przeciwciała pierwszorzędowe użyte w immunofluorescencji były specyficzne dla świni? Czy była przeprowadzona walidacja przeciwciał na tkankach świni? Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tej kwestii.
3. Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki wskazują, że chemeryna wpływa na procesy rozrodcze samicy, nie badano jednak molekularnego mechanizmu tego działania. Proszę wyjaśnić zatem, jakie Pani zdaniem mechanizmy mogą być zaangażowane w przekazywanie sygnału chemeryny w tych procesach?
4. Jaki problem badawczy, który wyłonił się z Pani badań, uważa Pani za najbardziej interesujący i zasługujący na wyjaśnienie (oraz dlaczego)?

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



Za najważniejsze osiągnięcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Edyty Rytelewskiej uznaję: (1) określenie ekspresji i lokalizacji chemeryny oraz jej receptorów w jajnikach świni domowej; (2) wykazanie, że ekspresja genów i białek chemeryny oraz jej receptorów zależy od dojrzałości płciowej swni, fazy cyklu rujowego i/lub okresu wczesnej ciąży; (3) określenie wpływu chemeryny na podstawową i stymulowaną LH/FSH i/lub insuliną sekrecję hormonów steroidowych w jajniku, oraz (4) wykazanie udziału chemeryny w regulacji białek zaangażowanych w proces angiogenezy i apoptozy w jajniku świni domowej.

Podsumowując, rozprawę Pani mgr Edyty Rytelewskiej oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona oryginalne, interesujące i kompleksowe opracowanie dostarczające nowych i ważnych informacji na temat roli chemeryny w regulacji funkcji jajnika świni domowej. Podjęta tematyka jest aktualna i nowatorska, a uzyskane wyniki wzbogacają w znaczący sposób dotychczasową wiedzę na temat udziału chemeryny w regulacji procesów rozrodczych świni. Uzyskane wyniki badań stanowią nie tylko wartość poznawczą, ale są również podstawą do planowania i prowadzenia kolejnych interesujących eksperymentów. Należy podkreślić, że przeprowadzone badania wymagały od Doktorantki znajomości aktualnej literatury, dużego zaangażowania i opanowania czasochłonnych technik badawczych.

WNIOSEK KOŃCOWY

Z pełnym przekonaniem uznaję, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Edyty Rytelewskiej zatytułowana: "Rola chemeryny w jajniku świni domowej (*Sus scrofa domestica L.*)" spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2022, r. poz.574 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 przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Edyty Rytelewskiej oraz dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną dysertacji oraz oryginalność uzyskanych wyników, co znajduje odzwierciedlenie w opublikowaniu ich w czasopismach o światowym zasięgu, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Magdalena Kowalik

dr hab. Magdalena Kowalik