



Dr hab. Aleksandra Pliszcak-Król  
Zakład Patofizjologii  
Katedra Immunologii, Patofizjologii  
i Prewencji Weterynaryjnej  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy  
ul. C.K. Norwida 31  
50 – 375 Wrocław

Wrocław, 22. 11. 2024 r.

## OCENA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Michała Plewika

pt. „**Znaczenie zmian stężenia kisspeptyn we krwi i płynie pęcherzykowym oraz ekspresji mRNA KISS-1 i KISS-1R w komórkach jajników w patogenezie torbieli pęcherzykowych**”.

Niniejsza recenzja została wykonana na wniosek Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Badania przedstawione w ocenianej dysertacji dotyczą tematu z zakresu neuroendokrynologii oraz ginekologii i położnictwa, któremu obecnie poświęca się wiele uwagi – roli kisspeptyn w regulacji funkcji rozrodczych u człowieka i zwierząt.

Kisspeptyny są peptydami, których synteza odbywa się w głównie w neuronach zgrupowanych w podwzgórze, w pobliżu neuronów GnRH – nadrzędnego elementu osi podwzgórze-przysadka-gonady, sprawującej kontrolę nad najważniejszymi aspektami rozrodu. Poprzez nadzorowanie dopływu i integracji sygnałów docierających do neuronów GnRH, kisspeptyny biorą udział w centralnej kontroli: inicjacji dojrzewania płciowego, przebiegu cyklu owulacyjnego i rujowego (dojrzewania pęcherzyków jajnikowych, owulacji) oraz przebiegu ciąży. Produkowane także w jajnikach, część tej kontroli realizują miejscowo, wpływając dodatkowo na syntezę estrogenów czy progesteronu.

Procesy związane z płodnością wymagają osiągnięcia krytycznej masy ciała i tkanki tłuszczowej oraz odpowiednich zasobów energetycznych. Rolę sygnału integrującego mechanizmy procesu reprodukcyjnego z przemianami metabolicznymi pełni leptyna, która posiada swoje receptory m.in. w podwzgórze, w obszarach występowania neuronów kisspeptynowych i neuronów GnRH. Leptyna jest polipeptydem produkowanym nie tylko w tkance tłuszczowej, mięśniach, nabłonku przewodu pokarmowego, ale także w podwzgórze, przysadce i jajnikach. Obok regulacji pobierania pokarmu i gospodarki energetycznej ustroju, znany jest też jej wpływ na wydzielanie GnRH i gonadotropin z przysadki mózgowej.

Istnieje bezpośrednia korelacja między efektami oddziaływania kisspeptyn i leptyny. Zaburzenia tej korelacji, związane z np. nieadekwatną syntezą i zmianami stężeń efektywnych



tych związków i/lub zmianami w ekspresji receptorów dla nich, prowadzą do istotnych, współistniejących zaburzeń zdolności reprodukcyjnej i metabolicznych.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje 86 stron, w tym 84 stron tekstu. W rozprawie wyróżniono 7 głównych rozdziałów, tj. Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Piśmiennictwo. Tekst pracy uzupełniają spis użytych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca, wzbogacona wykresami, schematami, wydrukiem obrazu USG, została napisana wg ogólnie przyjętego schematu i w poprawnym stylu.

W rozdziale Wstęp zostały przedstawione historia badań nad kisspeptynami i KISS-receptorami oraz aktualne, nowsze informacje dotyczące kisspeptyn i leptyny – ich wydzielania i wywierania efektu biologicznego (spełniania funkcji) w zestawieniu z fizjologią regulacji cyklu rujowego oraz implantacji zarodka i rozwoju ciąży. Bardzo pomocne w zrozumieniu tych zagadnień są dołączone kolorowe schematy (Ryc. 1-3). Dodatkowo zostały przedstawione etiopatogeneza, objawy i istota zaburzeń cyklu rujowego związane z występowaniem cyst jajnikowych. Takie wprowadzenie jest niezmiernie istotne.

Jednak cały rozdział wydaje się zbyt obszerny. Zbyt szczegółowe opisy wiedzy na ten temat u gryzoni są niepotrzebne, np. str. 18 (wersy: 21-25) - 19 (wersy: 1-9) i str. 20 (wersy: 5-7) - 21 (wersy: 1-4). Szczególnie, iż praca dotyczyła krów oraz, że występują pewne różnice w tym zakresie u obu gatunków. Zbyt rozbudowane są też opisy rycin – zawierają informacje przedstawione wcześniej w tekście rozdziału. Są drobne błędy redaktorskie, np.: skrót dla hipogonadyzmu hipogonadotropowego to HH nie CHH - str. 14 (wersy: 19,20) oraz skrót dla jądra przykomorowego-przednio-brzusznego w podwzgórzcu to AVPV a nie AVPN - Ryc. 1 i str. 18 (wers:3).

W drugim rozdziale zostały przedstawione cele badawcze pracy.

Celem badań o charakterze *in vivo* było określenie wartości średnich stężeń KISS-peptyny 10 w osoczu u krów:

- ✓ z prawidłowo przebiegającym cyklem rujowym i owulacją (krowy zdrowe),
- ✓ z tendencją tworzenia się torbieli pęcherzykowych i wystąpienia braku owulacji w kolejnych cyklach po porodzie (krowy z ryzykiem występowania zaburzeń cyklu rujowego),
- ✓ z potwierdzonym występowaniem cyst pęcherzykowych (krowy ze zdiagnozowanym zaburzeniem cyklu rujowego),

które później będą one mogły stanowić punkt odniesienia w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu prawidłowego/zaburzonego cyklu rujowego. Znajomość takich wartości jest niewątpliwie bardzo wartościowa, przede wszystkim dla lekarza weterynarii opiekującego się stadem wysokowydajnych krów mlecznych. Zamierzone także były oznaczania ekspresji mRNA kisspeptyn (mRNA KISS 1) i mRNA receptorów dla nich (mRNA KISS 1R) w komórkach pęcherzyków i cyst jajnikowych oraz badania *in vitro*: określające wpływ KISS-peptyny 10 na wydzielanie hormonu estrogenowego (17 $\beta$ -estradolu) przez hodowlane komórki ziarniste pęcherzyka jajnikowego, a także wpływ leptyny na zdolność tych komórek do wydzielania KISS-peptyny 10 i ekspresję w nich mRNA KISS-1, mRNA receptorów KISS 1 R i leptynowego (OB-

Rb). Oba typy przeprowadzonych badań uzupełniają się wzajemnie oraz, w sposób już bardziej precyzyjny, ukazują specyfikę współdziałania kisspeptyn i leptyny w centralnej i miejscowej regulacji cyklu rujowego w zdrowiu i chorobie.

Założenia pracy przedstawione są jasno i czytelnie. Jednak niepotrzebnie wydłużają ten rozdział fragmenty: str. 34 (wersy: 2-15) i str. 35 (wersy: 5-18), które zawierają informacje ujęte już w rozdziale pierwszym.

Rozdział trzeci Materiały i Metody zawiera opis procedur badawczych.

Schemat badań jak i dobór metod badawczych uważam za odpowiednie do realizacji zamierzonych celów pracy. Zastosowane zostały metody klasyczne, np. ocena żywotności komórek z użyciem błękitu trypanu oraz metody nowoczesne, tj. hodowla *in vitro* komórek ziarnistych pęcherzyków i cyst, oznaczanie stężeń KISS-peptyny 10 i leptyny techniką ELISA oraz stężenia 17 $\beta$ -estradiolu z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), metody izolacji i transkrypcji mRNA z użyciem gotowych kitów i techniki Real-Time PCR.

Pobieranie próbek krwi może być: pierwsze, drugie, kolejne ale na pewno nie może być pierwotne – str. 38 wers:18-21.

Wartości oznaczenia stężenia leptyn w osoczu krów wszystkich grup powinny być zamieszczone raczej w rozdziale Wyniki.

Niejasne są:

- ✓ opis czasu i częstotliwości pobierania krwi u jednej krowy. Ze zdania na str. 40 (wersy: 12-13) wynika, iż pobrano było cztery. Z opisu na str. 41 (wersy: 4-10) można się dowiedzieć, że jednak było ich więcej (24): w czterech kolejnych dniach pobierano krew 6-krotnie w odstępach 30-minutowych. Jakie było uzasadnienie dla tak częstego pobierania krwi ?

Brakuje informacji:

- ✓ dokładnie, w którym momencie została wyodrębniona grupa II. Można się tylko domyślać, że np. po drugim badaniu USG ?
- ✓ kiedy krowy były kryte, jaki był efekt ponownej synchronizacji ruji.
- ✓ czy zdolność komórek do syntezy hormonów po 85 godz. hodowli (czyli przed rozpoczęciem kontaktu z kisspeptyną) była oznaczana. Zdanie na str. 44 (wersy 13-15) sugeruje, że komórki były już aktywne w tym zakresie. Informacja taka pozwoliłaby na precyzyjniejsze określenie, rzeczywistego wpływu kisspeptyny.

Opis uzyskanych wyników badań zamieszczony jest w rozdziale czwartym.

Szkoda, że nie zostały podane konkretne wartości stężenia kisspeptyny w osoczu krów każdej grupy w poszczególnych dniach. Ułatwiłoby to znacznie odczytywanie wyników. Co prawda, wyniki można odczytać z wykresu, ale tylko orientacyjnie (w przybliżeniu) bowiem odległość kolejnych wartości stężeń na osi odciętej wykresu jest zbyt duża.

Na Ryc. 5-8 za pomocą małych liter wykazane zostały różnice statystycznie istotne między wartościami. Takie same litery zostały umieszczone nad każdą wartością, w każdej grupie doświadczalnej, zamieszczoną na wykresie. Brakuje informacji między jakimi wartościami i jakimi grupami różnice te występują – odczytanie analizy statystycznej otrzymanych wyników

jest w związku z tym niemożliwe. Podobnie, nie wiadomo co oznacza gwiazdka umieszczona nad punktem wartości średniego stężenia KISS-10 u krów grupy II w 21 dniu cyklu.

W opisach porównywania wartości badanych parametrów, to wartość grupy I lub grupy I/II (wartość kontrolna – krowy zdrowe) powinna być punktem odniesienia dla wartości grupy III (krowy z zaburzeniem owulacji w związku z obecnością cyst jajnikowych). Nie odwrotnie.

Trochę żałuję, że nie ma zestawienia czasowego (1 punkt czasowy) pomiaru stężenia KISS-10 w osoczu i w płynach: pęcherzykowym i z cysty. Pomiary w osoczu dokonywane były po rozdzieleniu grupy I i II, więc grupa kontrolna jest „czysta”, a obecność potencjalnego ryzyka zaburzeń owulacji została wyodrębniona. Takiego rozdzielania nie ma w przypadku pomiarów stężenia KISS-10 w płynach, więc gdy grupa kontrolna „jest obciążona” ryzykiem to wyniki należałoby interpretować z pewną ostrożnością.

Zdanie w opisie wyników: „Ekspresja kiss-1 mRNA w komórkach osłonki była natomiast statystycznie istotnie niższa ( $p \leq 0,05$ ), niż w komórkach ziarnistych pochodzących z obu badanych grup” (str. 56, wersy: 3-5) zawiera nieścisłość. Powinno być chyba, że różnica statystycznie istotna ( $p \leq 0,05$ ) w ekspresji mRNA KISS-1R w komórkach osłonki między grupami I/II i III była mniejsza niż różnica w ekspresji mRNA KISS 1 R w komórkach ziarnistych obu grup doświadczalnych.

Oceniana była żywotność izolowanych komórek ziarnistych oraz ich aktywność proliferacyjna. W pracy brakuje jakichkolwiek informacji nt. wyników tej oceny.

Interpretacja otrzymanych wyników (rozdział Dyskusja) nie budzi żadnych zastrzeżeń. Dyskusja jest przeprowadzona poprawnie, niestety jest trochę uboga.

Fragment tekstu na str. 64 (wersy: 17-22) jest powtórzeniem opisu wyników.

Wnioski wysunięte na podstawie wyników przeprowadzonych badań, opisanych w pracy, mają swoje uzasadnienie merytoryczne i sformułowane są poprawnie. Uwagę czytającego trochę rozprasza zamieszczenie wartości stężeń KISS-10 (wniosek 1, 2) i ich zakresów (wniosek 1,2, 3) w osoczu krów. Ujęte powinny być tylko wartości tych stężeń, które uznane zostały za markerowe.

Ostatni rozdział zawiera spis pozycji literaturowych, których jest 198. Obok naprawdę bardzo nielicznych, są to artykuły obcojęzyczne i obejmują swoim zasięgiem szeroki zakres czasu. Są wśród nich te starsze, które stanowią podstawę wiedzy potrzebną do podjęcia opisanych badań. Są też i te najnowsze. Wszystkie pozycje ujęte w spisie zostały wymienione w odpowiednich rozdziałach pracy, co świadczy o tym, iż Doktorant swobodnie posługuje się zdobytą w nich wiedzą.

Podsumowując, pracę doktorską pana lek.wet. Michał Plewik oceniam pozytywnie. Posiada ona znaczące walory poznawcze i wartość aplikacyjną. Doktorant wykazał duże zaangażowanie i swoim badaniom poświęcił wiele czasu. Przyjęte cele pracy realizował konsekwentnie, wykorzystując nowoczesne metody badawcze. Dobrze opanował techniki pracy laboratoryjnej. Wykazał się umiejętnością analizy otrzymanych wyników i wyłonienia odpowiednich wniosków.



Stwierdzam, iż dysertacja doktorska pana lek. wet. Michała Plewika pt. „**Znaczenie zmian stężenia kisspeptyn we krwi i płynie pęcherzykowym oraz ekspresji mRNA KISS-1 i KISS-1R w komórkach jajników w patogenezie torbieli pęcherzykowych**” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim - Ustawa z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. z późn. zm. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz.1669) i wnioskuję o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 22.11. 2024 r.

dr hab. Aleksandra Pliszczak-Król