

prof. dr hab. Anita Franczak
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Ocena rozprawy doktorskiej 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 u krów"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. wet. Michała Plewika została wykonana na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Urszuli Kosior-Korzeckiej, prof. UP w Lublinie.

Głównym celem badań było określenie znaczenia zmian stężenia kisspeptyn we krwi i płynie pęcherzykowym krów oraz zbadanie ilości transkryptu mRNA KiSS-1 i KiSS-1R w komórkach wyizolowanych z pęcherzyków jajnikowych oraz z cyst pęcherzykowych krów.

Cysty jajnikowe (CJ) są w 15 do 30% przyczyną przypadków czasowej lub trwałej niepłodności u krów, a zatem poszukiwanie przyczyn ich rozwoju, a także odkrycie markerów diagnostycznych i/lub prognostycznych jest w pełni uzasadnione. Na podkreślenie zasługuje przedstawione przez Doktoranta uzasadnienie celu badań, które jest krótką, ale merytoryczną analizą problemu. Stwierdzam, że podjęcie się realizacji przedstawionych badań było słuszne i jest w pełni uzasadnione. Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania przeprowadzono na dwóch modelach – zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* - co istotnie zwiększa wartość poznawczą i aplikacyjną uzyskanych wyników. W przedstawionym do recenzji manuskrypcie rozprawy nie uwzględniono jednak informacji o źródłach finansowania przeprowadzonych badań. Proszę o uzupełnienie tych informacji.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest samodzielną pracą naukową o charakterze eksperymentalnym i uporządkowanej, przemyślanej strukturze uwzględniającej streszczenie w języku polskim i języku angielskim, wstęp, opis materiałów i metod badawczych, opis wyników, dyskusję, wnioski oraz spis literatury. Przedstawiona rozprawa doktorska składa się zatem z rozdziałów charakterystycznych dla tego typu prac.

We wstępie rozprawy Autor w sposób syntetyczny przedstawił dotychczasowy stan wiedzy dotyczącej kisspeptin (KISSs), historii ich odkrycia, potencjalną rolę KISSs w regulacji funkcji układu rozrodczego samic i kontroli aktywności wydzielniczej osi podwzgórze-przysadka-jajniki, oraz potencjalną rolę w układzie nerwowym z uwzględnieniem ich związku ze statusem metabolicznym i funkcjami rozrodczymi. Ta część wstępu zawiera także istotne informacje dotyczące systemu KISS-KISSR, które w logiczny sposób prowadzą czytelnika do celów

szczegółowych przeprowadzonych badań i przekonują, że były one warte podjęcia. Stwierdzam, że Doktorant prawidłowo uzasadnił celowość podjętych badań oraz wybrał właściwe metody badawcze pozwalające na wykonanie zadań zmierzających do osiągnięcia wyznaczonych celów. Wyrażam także przekonanie, że cele badań są w pełni uzasadnione, jednakże Autor rozprawy nie przedstawił hipotezy, która jest elementem niezbędnym w badaniach naukowych. Wprawdzie na stronie 35. znajdujemy wyjaśnienie/opinię, że wartości parametrów związanych z układem KiSS-1/KiSS1R, tj. stężenie kisspeptyny-10 w osoczu krwi oraz poziom transkryptów mRNA kisspeptyn i ich receptorów KiSS1R w komórkach pęcherzyków jajnikowych i cyst pęcherzykowych mogłyby służyć jako wskaźniki diagnostyczne i /lub prognostyczne, ale stwierdzenie to jest raczej przypuszczeniem, a nie hipotezą. Proszę zatem o sformułowanie hipotezy badawczej, będącej zdaniem twierdzącym (twierdzeniem naukowym), założeniem w celu wyjaśnienia badanego zjawiska.

Problem złożonej etiologii cyst jajnikowych u krów, któremu Autor poświęcił jeden z interesujących podrozdziałów wstępu, sprawia że ustalenie przyczyn powstawania cyst pęcherzykowych i podjęcie skutecznej terapii jest trudne. Profilaktyka oraz poszukiwanie markerów diagnostycznych i/lub prognostycznych oraz znaczenie ich stężeń wskazujących m.in. na wysokie ryzyko zaburzeń owulacji i rozwoju cyst, może umożliwić podjęcie środków zapobiegawczych lub wczesne rozpoznanie i leczenie, co z punktu widzenia hodowlanego jest niezwykle istotne. Należy podkreślić, że badaniom towarzyszyły powyższe cele, co istotnie wzmacnia nie tylko wartość poznawczą, ale także aplikacyjną przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Badania przeprowadzono na krowach mlecznych rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, odmiany czarno-białej. Ze stada hodowlanego wyodrębniono grupę trzydziestu czterech osobników, którą na podstawie wyników uzyskanych podczas badania USG podzielono na trzy grupy:

- grupa I - krowy zdrowe cykliczne (n = 12), średnie stężenie leptyny 6,97 +/- 0,89 ng/ml
- grupa II - krowy zakwalifikowane w pierwszym badaniu po porodzie jako zdrowe cykliczne, u których po pierwotnym pobraniu próbek krwi w kolejnym cyklu nie doszło do owulacji i stwierdzono torbiele pęcherzykowe – (n = 12), średnie stężenie leptyny 6,80 +/- 0,86 ng/ml
- grupa III - krowy z cystami pęcherzykowymi stwierdzonymi podczas diagnozowania ciąży min 120 dni po porodzie (n=10), średnie stężenie leptyny 10,15 +/- 1,12 ng/ml.

W pierwszym etapie (badania *in vivo*) wykonano oznaczenia stężenia KISS-10 we krwi obwodowej oraz w płynie z torbieli jajnikowych i pęcherzyków jajnikowych pobranych podczas rutynowych czynności lekarsko-weterynaryjnych związanych z kontrolą i zarządzaniem rozrodem w stadzie. Do tej części eksperymentu nie mam uwag.

W II etapie badań (badania *in vitro*), od 35 krów podczas cyklu rujowego pobrano jajniki, a następnie z pęcherzyków jajnikowych o średnicy 15 – 19 mm wyizolowano komórki ziarniste w celu określenia wpływu leptyny (10^{-10} – 10^{-5} M) na wydzielanie KiSS-10 i wpływu KiSS-10 (10^{-10} – 10^{-5} M) na wydzielanie 17β -estradolu po 2, 12, 24 i 48 godz. hodowli *in vitro* tych komórek. Proszę o wyjaśnienie na jakiej podstawie dokonano wyboru dawek KISS-10 i leptyny oraz czasu inkubacji/hodowli *in vitro* komórek. Takich informacji nie znalazłam w rozdziale Materiał i metody. Proszę także o wyjaśnienie czy zwierzęta (35 krów podczas cyklu

rujowego), od który podczas uboju pobierano materiał wykorzystany w II etapie badań, były poddane analizie (i kontroli) w celu ustalenia rasy, odmiany, systemu hodowli, stanu zdrowia, wieku, masy ciała, a także poziomu leptyny we krwi obwodowej i KISS we krwi obwodowej i w płynie pęcherzykowym. Czy zwierzęta te były poddawane rutynowemu ubojowi gospodarskiemu? Autor nie odnosi się do tych aspektów w rozdziale Materiał i metody. Na podkreślenie jednak zasługuje fakt, iż Doktorant rzetelnie opisał metodykę przeprowadzonych badań *in vitro*, obejmującą hodowlę komórek ziarnistych izolowanych z pęcherzyków jajnikowych, izolację mRNA z komórek ziarnistych i komórek osłonki wewnętrznej, odwrotną transkrypcję, Real-Time PCR, oznaczanie leptyny i KiSS-10 metodą ELISA test oceny aktywności proliferacyjnej, oznaczanie 17 β -estradiolu w osoczu metodą HPLC z detekcją UVI analizę statystyczną.

Opis w tej części rozprawy jest wnikliwy, pozwala na adaptację i ponowne zastosowanie wykorzystanych metod badawczych. Doktorant nie uniknął jednak określeń, które stanowią rodzaj „żargonu laboratoryjnego”, np. „komórki osadzano poprzez wirowanie” – powinno być wirowano, „całość inkubowano w temperaturze pokojowej” – należałoby doprecyzować co inkubowano, „zmiany poziomu mRNA dla KiSS-1” – powinno być raczej zmiany ilości lub zmiany poziomu transkryptu mRNA KiSS-1 (ang. *mRNA transcript abundance*) i in.

Doktorant zamieścił także informację, że wykorzystane primery zaprojektowano przy użyciu programu Primer Express. Nasuwa się zatem pytanie, czy uzyskane produkty amplifikacji poddano sekwencjonowaniu? Proszę także o wyjaśnienie dlaczego jako kontrolę wewnętrzną wykorzystano fragment cDNA GAPDH owcy, a nie krowy i dlaczego zdecydowano się na wykorzystanie wyłącznie jednego genu referencyjnego?

Poprawy wymaga także sposób zapisu nazw genów, które wg przyjętej nomenklatury powinny być zapisane kursywą. W związku z tym należałoby napisać poziom ekspresji genu lub poziom ekspresji *KISS* lub *KISSR*, ale nie poziom ekspresji mRNA dla *KISS* lub mRNA dla *KISSR*, gdyż badano ilość transkryptów mRNA (ang. *mRNA transcript abundance*). Autor nie odniósł się do aspektów związanych z analizą specyficzności reakcji i analizą krzywych topnienia produktów reakcji Real Time PCR. Jeśli jednak uzyskane produkty poddano sekwencjonowaniu to czy otrzymane sekwencje porównywano z sekwencjami dostępowymi GeneBank badanych genów? Takie działania należałoby podjąć szczególnie przed wysłaniem pracy do druku.

Rozdział „Wyniki” jest napisany w sposób klarowny, a jego podział na podrozdziały - wyniki badań przeprowadzonych w warunkach *in vivo* i wyniki badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* – istotnie porządkuje tę część rozprawy i ułatwia zapoznanie się z rezultatami. Niemniej jednak w tej części rozprawy Autor nie uniknął błędów i niedociągnięć, m.in. związanych ze sposobem opisu zmian istotnych statystycznie. Stwierdzenia „najsilniej zaznaczony stymulujący”, „znaczące obniżenie”, „powodował obniżenie wydzielania 17 β -estradiolu w stosunku do kontroli” w opisie wyników są „naukowym żargonem”. Nie w każdym przypadku stwierdzenia te opatrzone informacją o poziomie istotności obserwowanych różnic (P). Na rycinie 11, przedstawiającej wpływ KISS-10 (10^{-10} - 10^{-5} M) na wydzielanie 17 β -estradiolu przez komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych, na osi OX błędnie uwzględniono dawkę KISS 10^{-11} , której wpływu nie badano.

Dyskusja pracy jest inspirująca, wielowątkowa i ciekawa z powodu trafnych spostrzeżeń i odniesień do literatury. Pozytywnie oceniam interpretację wyników własnych w tej części pracy oraz umiejętność ostrożnego podsumowania uzyskanych wyników. Uważam jednak, że rozdział rozprawy, który Doktorant określił jako „wnioski” ma charakter podsumowania w którym ponownie przytacza się uzyskane wyniki i słusznie wskazuje na ich „wstępny” potencjał (np. punkty 1-3). Proszę zatem o sformułowanie dwóch-trzech najważniejszych wniosków odnoszących się do postawionej hipotezy. Dodatkowo, proszę o ponowną analizę czy wykazano dodatnią „korelację” pomiędzy ekspozycją komórek na kisspeptynę-10 w stężeniach 10^{-10} - 10^{-9} M a sekrecją 17β -estradiolu oraz ujemną „zależność” pomiędzy kisspeptyną-10 w zakresie stężeń 10^{-9} - 10^{-5} M a sekrecją 17β -estradiolu z komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego – pkt. 7. Na czym polegała zależność, na czym polegała korelacja ?

Podsumowując, należy podkreślić, że przeprowadzenie eksperymentów z wykorzystaniem zarówno modelu *in vivo*, jak i *in vitro*, a następnie opracowanie i interpretacja uzyskanych wyników wymagały dużego nakładu rzetelnej pracy. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska pozwala na postawienie kolejnych pytań, jednakże Doktorant tego nie czyni i dlatego proszę o dyskusję i odniesienie się do tego aspektu podczas obrony pracy. Na czym, w opinii Doktoranta - lekarza weterynarii i praktyka - powinno polegać cyt. „precyzyjne ustalenie udziału układu KiSS1/ KiSS1R w patogenezie cyst pęcherzykowych u krów” w przyszłości? Proszę o opinię na czym powinny polegać kolejne etapy badań w celu rozwiązania tego naukowego problemu?

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska 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 u krów” autorstwa pana lek. wet. Michała Plewika stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie 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).


Anita Franczak

Olsztyn, dnia 12 listopada 2024 r.