

Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn-Kortowo, Polska, Telefon: +48 89 523 32 01

dr hab. Agata Żmijewska, prof. UWM
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
10-719 Olsztyn
Ul. Oczapowskiego 1A
agata.zmijewska@uwm.edu.pl

Olsztyn, dn. 11 sierpnia 2026 r.

Ocena rozprawy doktorskiej lek. wet. Natalii Szysiak
pt. „Udział neurokininy B, dynorfiny i kisspeptyn w etiopatogenezie opóźnienia
dojrzwiania płciowego u owiec”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Urszuli Kosior-Korzeckiej, prof. Uczelni

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Rozprawa doktorska podlegająca ocenie obejmuje trzy publikacje, wymienione poniżej, które zostały opublikowane w języku angielskim w uznanym czasopiśmie *Journal of Veterinary Research* znajdującym się na liście *Journal Citation Reports*. Łączna wartość Impact Factor z roku publikacji wynosi **4,5**, a suma punktów MNiSzW to **420**.

1. **Szysiak Natalia**, Kosior-Korzecka Urszula, Longo Vincenzo, Patkowski Krzysztof, Greguła-Kania Monika, Nowakiewicz Aneta, Bochniarz Mariola, Junkuszew Andrzej. Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes. *Journal of Veterinary Research* 2025; 69(1):121-129. doi: 10.2478/jvetres-2025-0003 (MEiN =140 pkt., IF 2025 =1,5).
2. **Szysiak Natalia**, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej. Effect of neurokinin B and dynorphin A on kisspeptin-10 secretion from the anterior pituitary cells of pubescent ewes in vitro. *Journal of Veterinary Research* 2025; 69(2):299-304. doi: 10.2478/jvetres-2025-0026 (MEiN =140 pkt., IF 2025 =1,5).
3. **Szysiak Natalia**, Kosior-Korzecka Urszula, Greguła-Kania Monika, Patkowski Krzysztof, Fila Mateusz, Junkuszew Andrzej. Relationship between Kisspeptin-10, Neurokinin B, and Dynorphin A in the course of normal and delayed puberty in ewes. *Journal of Veterinary Research* 2026; 70(1), 139-147, doi: 10.2478/jvetres-2026-0010 (MEiN=140 pkt., IF 2026 =1,5).

Publikacje są współautorskie (od 6 do 8 autorów) i na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka jest w nich pierwszym autorem. Autorem korespondencyjnym we wszystkich publikacjach składających się na rozprawę doktorską jest Pani Promotor dr hab. Urszula Kosior-Korzecka, profesor Uczelni. Z przedłożonych dokumentów wynika, że indywidualny wkład doktorantki w powstanie poszczególnych prac jest szacowany na 55%. Z oświadczeń, które zostały dołączone do przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej wynika, że Pani lek. wet. Natalia Szysiak miała wiodący udział w powstawaniu poszczególnych publikacji. Oświadczenia, które zostały zawarte w rozprawie doktorskiej są zgodne z oświadczeniami zamieszczonymi w publikacjach naukowych. Z przedłożonych oświadczeń wynika, że Pani Natalia Szysiak brała udział w opracowaniu koncepcji prac, realizacji badań, zestawieniu, analizie i interpretacji danych, napisaniu pierwszej wersji manuskryptu, dokonaniu korekty po recenzjach, krytycznej ocenie artykułów oraz ostatecznej akceptacji publikacji. Pod względem formalnym oceniana rozprawa spełnia wszelkie wymogi stawiane tego typu opracowaniom. Po przeanalizowaniu przedstawionych materiałów stwierdzam, że złożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie formalne kryteria określone w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.).

Wiedza na temat mechanizmów regulujących dojrzewanie płciowe u samic stale się poszerza. Coraz więcej badań wskazuje, że obok klasycznych regulatorów istotną rolę odgrywają również nowo poznawane neuropeptydy oraz adipokiny, które poprzez działanie ośrodkowe i lokalne modulują funkcjonowanie osi podwzgórze-przysadka-gonady. Wśród regulatorów tego procesu znajdują się neuropeptydy KNDy – kisspeptyna (KiSS), neurokinina B (NKB) i dynorfina A (Dyn A), których wzajemne oddziaływania oraz znaczenie w neuroendokrynnej kontroli dojrzewania płciowego owiec stanowiły główny przedmiot badań przedstawionych w cyklu prac. Przeprowadzone badania obejmowały zarówno eksperymenty *in vitro* na komórkach przedniego płata przysadki jak i analizy *in vivo* zmian stężeń KiSS, NKB i Dyn A podczas dojrzewania płciowego u jarek i pozwoliły lepiej poznać wzajemne zależności między tymi neuropeptydami oraz ich wpływ na wydzielanie hormonów odpowiedzialnych za rozpoczęcie aktywności rozrodczej. Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej lek. wet. Natalii Szysiak zostały już pozytywnie ocenione w procesie recenzji wydawniczej. Dlatego też w niniejszej recenzji przedmiotem oceny jest przede wszystkim ich wartość poznawcza, poziom naukowy oraz znaczenie dla rozwoju dyscypliny.

Opublikowana w 2025 roku praca oryginalna pt. *"Influence of neurokinin B, dynorphin A and kisspeptin-10 on in vitro gonadotropin secretion by anterior pituitary cells isolated from pubescent ewes"* (cytowana dotychczas 2 razy), dotyczyła określenia roli neuropeptydów podwzgórzowych, tj. KiSS-10, NKB oraz Dyn A w regulacji czynności wydzielniczej komórek przedniego płata przysadki 10-miesięcznych samic owiec w okresie dojrzewania płciowego. Doktorantka wraz ze współpracownikami zbadała, czy związki te mogą bezpośrednio modulować wydzielanie hormonu luteinizującego (LH) i hormonu folikulotropowego (FSH), które odgrywają kluczową rolę w inicjacji i utrzymaniu funkcji rozrodczych. Rezultaty badań wykazały, że badane neuropeptydy wpływały stymulująco na aktywność wydzielniczą komórek przysadki, przy czym zakres i siła efektu zależały od rodzaju neuropeptydu, jego stężenia oraz czasu inkubacji. Uzyskane wyniki wskazują, że kisspeptyna-10, neurokinina B i dynorfina A uczestniczą nie tylko w regulacji aktywności podwzgórza, ale mogą również

oddziaływać lokalnie, bezpośrednio na przysadkę, co potencjalnie może wpływać na funkcjonowanie osi HPG u jarek.

Publikacja 2 (rok publikacji 2025) „*Effect of neurokinin B and dynorphin A on kisspeptin-10 secretion from the anterior pituitary cells of pubescent ewes in vitro*”, dotyczyła zbadania, czy NKB oraz Dyn A mogą bezpośrednio regulować wydzielanie kisspeptyny-10 (KiSS-10) przez izolowane komórki przedniego płata przysadki owiec w okresie dojrzewania płciowego. Kisspeptyna jest jednym z najważniejszych regulatorów aktywności osi podwzgórze-przysadka-gonady, jednak mechanizmy kontrolujące jej wydzielanie na poziomie przysadki pozostają słabo poznane. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że neurokinina B istotnie zwiększała wydzielanie KiSS-10, a efekt ten zależał zarówno od zastosowanego stężenia, jak i czasu działania neuropeptydu. Natomiast dynorfina A nie wpływała na sekrecję KiSS-10 przez komórki przysadki. Uzyskane wyniki wskazują, że neurokinina B może uczestniczyć w lokalnej regulacji wydzielania kisspeptyny w przysadce, co sugeruje jej potencjalne znaczenie w mechanizmach inicjujących dojrzewanie płciowe oraz aktywujących funkcje rozrodcze u owiec.

Publikacja 3 z 2026 roku pt. „*Relationship between Kisspeptin-10, Neurokinin B, and Dynorphin A in the course of normal and delayed puberty in ewes*” dotyczyła zbadania zależności *in vivo* między stężeniami KiSS-10, NKB oraz Dyn A podczas prawidłowego oraz opóźnionego dojrzewania płciowego u jagniąt owiec pochodzących z ciąż pojedynczych i bliźniaczych. Wykazano, że wraz z wiekiem i zbliżaniem się do pierwszej owulacji stężenia KiSS-10 oraz NKB stopniowo wzrastały, natomiast stężenie Dyn A ulegało obniżeniu, przy czym zmiany te następowały później u owiec z ciąż bliźniaczych. Zaobserwowano dodatnią korelację między stężeniami KiSS-10 i NKB oraz ujemną korelację obu tych neuropeptydów z Dyn A. Wyniki wskazują, że skoordynowane zmiany aktywności neuropeptydów KNDy są ściśle związane z aktywacją osi HPG oraz rozpoczęciem funkcji rozrodczych u owiec. Przeprowadzone badania mają istotne znaczenie nie tylko dla pogłębienia wiedzy o neuroendokrynnych mechanizmach regulujących rozród, ale również z punktu widzenia praktyki hodowlanej. Lepsze poznanie czynników warunkujących termin osiągnięcia dojrzałości płciowej może przyczynić się do opracowania skuteczniejszych metod zarządzania rozrodem, ograniczenia przypadków opóźnionego dojrzewania oraz poprawy wskaźników płodności. W konsekwencji może to prowadzić do zwiększenia efektywności produkcji zwierzęcej, skrócenia okresu nieprodukcyjnego zwierząt i ograniczenia strat ekonomicznych ponoszonych przez hodowców.

Publikacje i oświadczenia współautorów są poprzedzone opracowaniem w języku polskim obejmującym oprócz oświadczenia promotora rozprawy doktorskiej, wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu, spis treści, wykaz skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, hipotezę i cel badań, materiały i metody, wyniki i dyskusję, wnioski oraz bibliografię liczącą 46 pozycji.

W bardzo krótkim *Wstępie* doktorantka scharakteryzowała obecny stan wiedzy dotyczący obecności badanych neuropeptydów i ich receptorów oraz roli tych systemów w regulacji osi HPG oraz w inicjacji dojrzewania płciowego u owiec. Podkreśliła także, że wiedza dotycząca ich wzajemnych oddziaływań, zwłaszcza na poziomie przysadki mózgowej u owiec, pozostaje nadal niewystarczająco poznana. Przegląd aktualnego stanu wiedzy (wzbogacony o schemat graficzny) pozwolił zidentyfikować najważniejsze luki badawcze dotyczące mechanizmów

działania tych neuropeptydów oraz ich związku z opóźnionym dojrzewaniem płciowym. Stanowiło to podstawę do sformułowania trzech hipotez badawczych oraz 4 celów szczegółowych. W mojej opinii sformułowano je poprawnie, a założenia pracy zostały zrealizowane przez doktorantkę z sukcesem.

Rozdział *Materiały i metody* został opracowany w sposób przejrzysty i logiczny. Doktorantka scharakteryzowała modele doświadczalne używane do realizacji celów 1-4, opisała przebieg badań oraz zastosowane procedury eksperymentalne, a także przedstawiła metody analizy statystycznej i opracowania uzyskanych wyników. Uzupełnieniem tego rozdziału jest schemat doświadczenia *in vivo* oraz 3 autorskie fotografie przedstawiające morfologię komórek przysadki w trakcie hodowli *in vitro* po 12, 48 oraz 72 godzinach po izolacji. Chciałabym wspomnieć jedynie, że w przypadku doświadczeń *in vitro* trwających do 24 godzin bardziej precyzyjne byłoby stosowanie terminu „inkubacja” niż „hodowla”. Rozdział został przygotowany poprawnie i odpowiada standardom obowiązującym dla tego typu opracowań. Jednocześnie jego szczegółowa analiza pozwoliła wskazać kilka elementów wymagających doprecyzowania oraz przedstawić uwagi, których uwzględnienie mogłoby wpłynąć na zwiększenie wartości merytorycznej i czytelności tej części rozprawy. Ani w opisie ani w publikacjach nie przedstawiono uzasadnienia, dlaczego w badaniach wykorzystano owce rasy Uhruska. Ponadto w opisie metodyki doświadczeń w polskojęzycznym streszczeniu do realizacji celów 3 i 4 Doktorantka podaje, że wykorzystano 12 samic, tj. 6 owiec z grupy S oraz 6 z grupy T, natomiast w publikacjach 1 i 2 taki podział nie jest sprecyzowany, a wspomniana jest tylko ogólna liczba zwierząt $n=6$. Prosiłabym o doprecyzowanie tej kwestii w trakcie obrony. Nie znalazłam również informacji, na jakiej podstawie dobrano stężenia (10^{-11} – 10^{-7} M) do hodowli *in vitro* badanych neuropeptydów. W opracowaniu polskojęzycznym ani w publikacjach 2 i 3 nie znalazłam również informacji dotyczącej zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej analiz stężenia KiSS-10 oraz czułości poszczególnych analiz ELISA (LH, FSH i KiSS-10). Czy oznaczenia wykonywano jednorazowo czy w powtórzeniach technicznych? Ponadto, czy próby pobierane co 15 min przez 2 godziny analizowano oddzielnie, czy też traktowano je jako próbę zbiorczą? W publikacji 1 Doktorantka wspomina, że żywotność komórek była oceniana po 24 h i 48 h oraz 72 h i 96 h, a wynosiła odpowiednio 97% oraz 96%. Jednakże nie podano, czy żywotność komórek była również badana po dodaniu czynników np. testem alamarBlue oraz czy podobne analizy były prowadzone w przypadku hodowli opisanych w publikacji 2. Ponadto opis analiz statystycznych wymaga doprecyzowania. Doktorantka nie wskazała, jaki rodzaj analizy wariancji zastosowano (np. jednoczynnikową czy z powtarzanymi pomiarami) oraz jakie czynniki uwzględniono w modelu statystycznym.

W rozdziale *Wyniki* Doktorantka przedstawiła w opisie oraz na 13 wykresach i 2 tabelach najważniejsze rezultaty badań uzyskanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Rozdział ten podzielono na podrozdziały dotyczące eksperymentów *in vivo* oraz *in vitro* (co zbieżne jest z podziałem przedstawionym w *Materiałach i metodach*). Przedstawione wykresy i tabele stanowią spolszczoną wersję wyników przedstawionych w publikacjach. Po analizie tej części rozprawy stwierdzam, że uzyskane wyniki są interesujące i świadczą o złożoności mechanizmów regulujących uzyskanie dojrzałości płciowej u jarek. Przedstawiony rozdział został przygotowany w sposób właściwy, choć jego szczegółowa analiza pozwoliła na wskazanie kilku kwestii wymagających komentarza lub doprecyzowania. Zarówno

w publikacji 1, jak i polskojęzycznym opracowaniu, w opisie wyników pojawiają się pewne generalne stwierdzenia, przykładowo „*Kisspeptin-10 at 10^{-11} – 10^{-8} M caused an increase in the LH secretion compared to the control throughout the experiment.*” oraz „*KiSS-10 w stężeniu 10^{-11} – 10^{-8} M powodowała wzrost wydzielania LH w porównaniu z kontrolą przez cały czas trwania doświadczenia.*” lub też „*The exposure of the cells to all the NKB doses used had a stimulating effect on LH secretion relative to the control. A marked increase in secretion was induced by 10^{-10} – 10^{-7} M of NKB after 4–24 h.*” oraz „*NKB we wszystkich zastosowanych dawkach miała stymulujący wpływ na wydzielanie LH w porównaniu do kontroli. Wykazano wzrost wydzielania LH pod wpływem NKB w stężeniach 10^{-10} – 10^{-7} M po 4, 12, 24 godz.*”. Biorąc pod uwagę brak statystycznie istotnych różnic, np. na Ryc. 8 i Ryc. 10 oraz Fig. 1 i Fig. 4 (po 4 godzinach inkubacji), w mojej ocenie nie jest zasadne formułowanie wniosków sugerujących wzrost lub spadek poziomu badanych hormonów przez cały czas trwania doświadczenia. Podobne uwagi dotyczą również analiz innych hormonów. W przyszłości zalecałabym unikanie tego rodzaju sformułowań i ograniczenie interpretacji wyników do zmian potwierdzonych analizą statystyczną. Dodatkowo z punktu widzenia recenzenta chciałabym zwrócić uwagę, że Doktorantka w *Materialach i metodach* napisała „*We wszystkich analizach za próg istotności statystycznej przyjęto poziom $P \leq 0,05$.*”, jednakże w *Wynikach* i publikacjach przedstawiono wyłącznie wartości współczynników r , co nie pozwala ocenić, czy obserwowane zależności były statystycznie istotne. Jeśli korelacje nie osiągnęły istotności statystycznej, wyciąganie wniosków o zależności między stężeniem neuropeptydów a wydzielaniem LH czy FSH jest problematyczne. W opisie wyników Doktorantka interpretuje wartości współczynników korelacji Pearsona, posługując się określeniami „słaba”, „umiarkowana”, „wysoka”, „bardzo wysoka” oraz „doskonale dodatnia korelacja”. Jednocześnie nie wskazuje kryteriów ani źródła literaturowego, na podstawie których dokonano takiej klasyfikacji. Ponadto zauważalne są pewne niekonsekwencje w interpretacji tych samych wartości współczynników korelacji. Przykładowo, w publikacji nr 2 dla zależności pomiędzy NKB a LH użyto określenia „low positive correlation”, natomiast w rozprawie te same zależności opisano jako „umiarkowaną dodatnią oraz słabą dodatnią korelację”. W związku z tym wskazane byłoby ujednolicenie sposobu interpretacji współczynników korelacji oraz podanie źródła przyjętej klasyfikacji, co zwiększyłoby przejrzystość i jednoznaczność prezentacji wyników. Prosiłabym także o pogłębioną interpretację braku wpływu Dyn A na wydzielanie KiSS-10, mimo że w modelu *in vivo* wykazywała silną zależność od jej stężenia (oprócz „poziomu anatomicznego” wspomnianego w Dyskusji). Czy Doktorantka uważa, że mogło mieć to związek ze zmianami ekspresji receptorów w komórkach hodowanych *in vitro* i czy wykonanie takich analiz było przez Panią rozważane? W publikacji oraz w polskojęzycznym opracowaniu wspomniano, że aktywność jajników monitorowano metodą laparoskopową. Należy jednak zaznaczyć, że pełniejsza ocena aktywności jajników mogłaby być uzupełniona o oznaczenie stężeń hormonów steroidowych, zwłaszcza progesteronu i estradiolu w osoczu krwi. Pozwoliłoby to na kompleksową ocenę zarówno zmian morfologicznych, jak i czynności endokrynnej jajników. Ponadto w opracowaniu polskojęzycznym zabrakło informacji dotyczących obserwacji związanych z terminem wystąpienia pierwszej owulacji. Dane te przedstawiono w publikacji nr 3, w której wykazano, że pierwsza owulacja u jarek pochodzących z ciąży pojedynczych występowała w 8. miesiącu życia, natomiast u jarek z ciąży bliźniaczych dopiero w 10. miesiącu życia. W związku

z tym sformułowanie zawarte we wniosku nr 1, odnoszące się do zmian zachodzących „na 4 tygodnie przed rozpoczęciem aktywności rozrodczej” uważam za wymagające wyjaśnienia. Nie jest bowiem jasne, do którego momentu rozpoczęcia aktywności rozrodczej odnosi się ten zapis oraz na jakiej podstawie wyznaczono wskazany czterotygodniowy okres.

Rozdział *Dyskusja* obejmuje ponad 4 strony maszynopisu i Doktorantka odnosi w nim swoje wyniki badań do rezultatów uzyskanych przez innych Autorów, co świadczy o jej bardzo dobrym przygotowaniu i zrozumieniu tematyki badawczej. Dodatkowym aspektem świadczącym o dojrzałości naukowej Doktorantki jest przedstawianie ograniczeń związanych z uzyskanymi wynikami. Sugerowałabym jedynie, aby w większym stopniu uwypuklono nowatorstwo przeprowadzonych badań w odniesieniu do dostępnej literatury. Który z uzyskanych wyników uważa Pani za najważniejszy i dlaczego?

Na zakończenie chciałabym przedstawić kilka pytań, które nasunęły mi się podczas analizy ocenianej rozprawy doktorskiej:

1. Dlaczego jako model opóźnionego dojrzewania wybrano owce pochodzące z ciąż bliźniaczych?
2. Czy opóźnienie dojrzewania było wyłącznie konsekwencją niższej masy ciała, czy również zmian w układzie KNDy?
3. W swojej pracy oraz we wstępie wspominała Pani o leptynie, adipokinie znanej jako jeden z kluczowych regulatorów osi HPG oraz układu kisspeptynowego. Czy znane są Pani również inne adipokiny, które mogą być zaangażowane w regulację aktywności systemu KNDy?
4. Jak Pani wyniki mogą zostać wykorzystane w hodowli owiec? Czy KiSS-10 lub NKB mogłyby stanowić biomarkery przewidywania terminu dojrzewania płciowego?
5. Jakie eksperymenty funkcjonalne mogłyby w przyszłości poszerzyć wiedzę na temat mechanizmów działania neuropeptydów w regulacji procesów rozrodczych?
6. Czy uzyskane wyniki można przenieść na inne gatunki zwierząt gospodarskich lub człowieka?

Podsumowując, uzyskane wyniki badań dostarczyły nowych danych dotyczących mechanizmów hormonalnej kontroli dojrzewania płciowego u owiec, stanowią cenny wkład w poznanie neuroendokrynnych podstaw regulacji procesów rozrodczych oraz uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat roli neuropeptydów KNDy w regulacji dojrzewania płciowego u owiec. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością omawianej problematyki oraz umiejętnością właściwego zaplanowania i przeprowadzenia badań z wykorzystaniem odpowiednich metod eksperymentalnych. Przedstawiona rozprawa świadczy o zdobyciu przez Doktorantkę doświadczenia w prowadzeniu badań naukowych oraz umiejętności właściwej interpretacji uzyskanych wyników. Publikacje naukowe tworzą przejrzystą i logiczną całość, są napisane w sposób klarowny, z wyraźnie określonymi celami badawczymi, opisem metod analitycznych oraz prezentacją uzyskanych wyników. Każda z publikacji zawiera również interesującą dyskusję. W związku z tym uważam, że prace te stanowią tematycznie spójny zbiór artykułów naukowych, opublikowanych w uznanym czasopiśmie, co w pełni odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. Chciałabym zaznaczyć, że wszystkie przedstawione uwagi i sugestie mają charakter dyskusyjny oraz nie wpływają na pozytywną ocenę rozprawy. Wyrażam nadzieję, że zostaną

wykorzystane w dalszych badaniach oraz podczas przygotowywania kolejnych publikacji naukowych.

W moim przekonaniu, przedstawiona do oceny rozprawa lek. wet. Natalii Szysiak pt. „Udział neurokininy B, dynorfiny i kisspeptyn w etiopatogenezie opóźnienia dojrzewania płciowego u owiec” jest opracowaniem spełniającym wszystkie wymagania określone w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2024 r. poz.1571 z późn. zm). Na tej podstawie zwracam się do Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie lek. wet. Natalii Szysiak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk weterynaryjnych, w dyscyplinie weterynaria.

Z poważaniem

Agata Zimjerska

