

Dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
Tel. 012 664 50 03
agnieszka.rak@uj.edu.pl

Kraków, dnia 17.11.2023 r.

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ MGR JULII MATUSZEWSKIEJ

pt. „Wpływ diety kafeteryjnej matki na układ immunologiczny, profil metaboliczny i hormonalny oraz funkcje rozrodcze potomstwa szczurów”

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny *Nauki Biologiczne* Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Pracowni Neurobiologii Katedry Zoologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod opieką naukową Pań promoterek Profesor Joanny Śliwowskiej i Profesor Agaty Chmurzyńskiej. Podstawą rozprawy doktorskiej są dwie spójnie tematycznie publikacje naukowe, które ukazały w się w prestiżowych, recenzowanych, międzynarodowych czasopismach z listy *Journal Citation Reports: Scientific Reports (IF 4.996)* oraz *Biology of Reproduction (IF 3.6)* w latach 2021 i 2023, odpowiednio.

Publikacja 1: **Matuszewska J**, Zalewski T, Klimaszyk A, Ziarniak K, Jurga S, Chmurzynska A, Sliwowska JH. Mothers' cafeteria diet induced sex-specific changes in fat content, metabolic profiles, and inflammation outcomes in rat offspring. *Sci Rep.* 2021 Sep 17;11(1):18573. doi: 10.1038/s41598-021-97487-x.

Publikacja 2: **Matuszewska J**, Nowacka-Woszek J, Radziejewska A, Grzęda E, Pruszyńska-Oszmałek E, Dylewski Ł, Chmurzynska A, Sliwowska JH. Maternal cafeteria diet and reproductive functions in offspring. *Biol Reprod.* 2023 Sep 4;:ioad101. doi: 10.1093/biolre/iodad101.

Czasopisma te znajdują się również w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki z przyznanymi odpowiednio punktami 140 i 200. Łączny współczynnik wpływu IF (*Impact Factor*) czasopism stanowiących podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora nauk biologicznych

wynosi 8.596, a liczba punktów Ministerialnych to 340. Publikacje są współautorskie (7 - 8 autorów) i w obu pracach Pani mgr Julia Matuszewska jest pierwszą autorką, a na podstawie załączonych oświadczeń współautorów prac wynika, że Jej wkład w ich powstanie jest znaczący i obejmuje m.in. udział w planowaniu eksperymentów, przeprowadzeniu eksperymentów na zwierzętach, pobieraniu tkanek do dalszych badań, udziale w badaniach z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego (MRI), przeprowadzeniu analiz immunoenzymatycznych (ELISA), PCR w czasie rzeczywistym (rt-PCR), obróbce danych, przygotowaniu wykresów i tabel oraz tekstu manuskryptów. Badania do pracy doktorskiej wykonano w oparciu o środki finansowe pochodzące z Narodowego Centrum Nauki (NCN) w ramach projektu Preludium: 2019/35/N/NZ9/00663, kierownictwa Doktorantki i dwóch dofinansowań zadań badawczych dla Młodych Naukowców nr 506-511-09-00.

Informacje o kandydatce

Pani mgr Julia Matuszewska uzyskała tytułu magistra neurobiologii w dniu 3.07.2018, nadany przez Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz Akademię Wychowania Fizycznego w Poznaniu, nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora a studia doktoranckie realizowała na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, Katedrze Zoologii, Pracowni Neurobiologii (obecnie Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Zakład Patofizjologii Starzenia i Chorób Cywilizacyjnych) a obecnie pracuje na stanowisku samodzielnego referenta naukowo-technicznego.

Ocena merytoryczna

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy określenia wpływu diety kafeterijnej (KAT) podawanej samicom szczura w okresie przed ciążą, w czasie ciąży i laktacji na układ immunologiczny, profil metaboliczny i hormonalny oraz funkcje rozrodcze potomstwa. Przedmiotem zainteresowania Doktorantki jest programowanie prenatalne, które dotyczy zależności między odżywianiem się matki w ciąży, a jakością życia potomstwa w przyszłości. Nieprawidłowy bilans energetyczny oraz ilość składników odżywczych w diecie znacząco wpływają na rozwój płodu. U ludzi stwierdzono silną korelację pomiędzy niską masą urodzeniową, wysokim poziomem kortyzolu i późniejszym rozwojem nadciśnienia tętniczego i cukrzycy typu 2. Potomstwo matek, które cierpią na cukrzycę w czasie ciąży jest narażone na większe ryzyko rozwoju otyłości i nieprawidłowego metabolizmu glukozy nie tylko w dzieciństwie, ale także w okresie dojrzewania i dorosłości. Od kilku lat prowadzone są także badania nad wpływem diety matki podczas ciąży na parametry metaboliczne potomstwa, a prace Zespołu Profesor Joanny Śliwowskiej przyczyniły się do poznania m.in. wpływu diety wysokotłuszczowej na histologię gonad sugerując wpływ na funkcje rozrodcze. Co ciekawe, wiele danych obserwacji klinicznych i badań w modelach zwierzęcych wskazuje, że otyłość prowadzi do zaburzeń związanych z dojrzewaniem i funkcją rozrodczą. Wykazano także, że dieta KAF podawana przed ciążą, a także w czasie ciąży i laktacji przyspiesza początek pokwitania u potomstwa samic, ma negatywny wpływ na jajniki oraz zmniejsza produkcję testosteronu i jakość plemników u samców. Zmiany te mogą być spowodowane zaburzeniami równowagi energetycznej we wczesnym okresie życia i mieć długotrwałe patologiczne konsekwencje w późniejszym okresie życia. Stąd, pozytywnie oceniam wybór tematyki pracy doktorskiej, jest on logiczną konsekwencją wcześniejszych obserwacji, zmierzającą do zrozumienia zmian w funkcjonowaniu układu immunologicznego i hormonalnego potomstwa otyłych matek. Jest to niezmiernie ważne

ponieważ obecnie obserwuje się epidemię otyłości, której poważną konsekwencją są m.in. zaburzenia płodności. W mojej ocenie, kolejnym ważnym elementem zasługującym na uznanie i potwierdzającym bardzo istotny i nowatorski charakter badań prowadzonych przez Panią mgr Julię Matuszewską jest fakt, że Jej doktorat finansowany był z projektu badawczego Preludium, który został poddany wnikliwej recenzji i uzyskał akceptację przez NCN.

Przedstawione do analizy opracowanie polskojęzyczne obejmuje 110 strony a jego układ jest standardowy dla tego typu prac dyplomowych i obejmuje: wykaz skrótów używanych w pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim. Następnie, Wstęp liczący 13 stron stanowi szczegółowe wprowadzenie do zagadnień poruszanych w rozprawie doktorskiej i składa się z pięciu podrozdziałów opisujących: otyłość – choroba cywilizacyjna, programowanie prenatalne, modele zwierzęcej otyłości z wyróżnieniem modelu ekspozycji na KAF, model zwierzęcy wywoływania otyłości u potomstwa poprzez ekspozycję matek w okresie ciąży i/lub laktacji na KAF, oś podwzgórze-przysadka mózgowa -gonady i regulacja jej działania. Następny rozdział dysertacji obejmuje Hipotezy i Cele badań. Doktorantka postawiła kilka hipotez badawczych, które zakładają, iż krótkotrwała (10 tyg.) ekspozycja samic szczurów na KAF wpływa na masę i skład ciała jej potomstwa oraz prowadzi do płciowo-specyficznych zamian w profilu metabolicznym potomstwa. Długotrwała (16 tyg.) ekspozycja samic szczurów na KAF prowadzi do płciowo-specyficznych zamian w profilu metabolicznym i hormonalnym potomstwa oraz zakłóca dojrzewanie płciowe u potomstwa płci żeńskiej. Spożycie KAF przez samice szczurów przed ciążą oraz podczas ciąży i laktacji wywiera specyficzny płciowo wpływ na poziom mRNA dla *Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn* oraz *Tac2* w podwzgórzu oraz *Kiss1*, *Gpr54* oraz *Sirt1* w wątrobie u ich potomstwa, a układ *Sirt1/Kiss1* w podwzgórzu i/lub wątrobie przyczynia się do obserwowanych zmian metabolicznych i zaburzeń rozrodczych potomstwa. W celu weryfikacji hipotez Doktorantka jasno i precyzyjnie opisała zadania badawcze: *i*). ocena wpływu matczynej KAF podawanej w okresie przed ciążą oraz w czasie ciąży i laktacji na masę i skład ciała potomstwa, *ii*). analiza ekspozycji matek na KAF przed ciążą oraz w trakcie ciąży i laktacji na wystąpienie płciowo-specyficznych zmian w profilu metabolicznym, hormonalnym i immunologicznym potomstwa, *iii*). ocena długotrwałych efektów KAF matki na proces dojrzewania płciowego potomstwa płci żeńskiej, *iv*). porównanie poziomu transkryptu dla *Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn* i *Tac2* w podwzgórzu oraz *Kiss1*, *Gpr54* i *Sirt1* w wątrobie potomstwa szczurów obu płci w różnych punktach rozwojowych.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorantka dokładnie i szczegółowo opisuje przebieg eksperymentu 1 i 2 charakteryzując KAF, badanie składu ciała „matek” szczurzych, badanie z wykorzystaniem MRI, pobieranie materiału, ocenę profilu metabolicznego, immunologicznego i hormonalnego potomstwa, za pomocą testów ELISA oraz analizę poziomu transkryptu *Kiss1*, *Gpr54*, *Tac2*, *Pdyn* oraz *Sirt1* w podwzgórzu oraz *Kiss1*, *Gpr54* i *Sirt1* w wątrobie potomstwa używając rt-PCR oraz analizę statystyczną. W doświadczeniach badano dwie grupy: grupę karmioną KAF (krótkoterminowa i długoterminowa ekspozycja), składającą się z ogólnie dostępnych produktów w sklepach, o dużej zawartości węglowodanów i tłuszczu oraz kontrolną, która otrzymywała dietę półsyntetyczną AIN93G. Zastosowany w badaniach szczurzy model oraz analizy laboratoryjne zostały prawidłowo dobrane do założonych celów badawczych i wymagały dużego nakładu pracy Doktorantki.

Kolejny rozdział to Opis wyników, który powstał na bazie dwóch eksperymentów przeprowadzonych na samicach szczura Wistar oraz ich potomstwie. W mojej opinii wszystkie zadania badawcze zostały rzetelnie zrealizowane a postawione hipotezy poprawnie zweryfikowane. Wyniki doświadczeń zostały bardzo bogato zilustrowane. Przedstawiono je na rycinach skomponowanych z wykresów, zdjęć mikrofotografii oraz tabel i są dobrze i prawidłowo opisane. Należy

podkreślić, że cała dokumentacja wyników rozprawy doktorskiej Pani mgr Juli Matuszewskiej jest na doskonałym poziomie, co potwierdza staranne przeprowadzenie wszystkich eksperymentów i szczegółową ich analizę.

Na podstawie przeprowadzonych badań uzyskano dużo ciekawych, wartościowych i oryginalnych wyników badań. Pozwalam sobie przytoczyć tylko najważniejsze wnioski płynące z badań:

- potomstwo matek z grupy KAF charakteryzuje się obniżoną masą ciała oraz zaburzeniami składu ciała.
- ekspozycja samic na KAF przed ciążą oraz w okresie prenatalnym i wczesno postnatalnym prowadzi do wystąpienia płciowo-specyficznych zmian w profilu metabolicznym, hormonalnym i immunologicznym potomstwa.
- potomstwo płci żeńskiej jest bardziej wrażliwe na efekty krótkotrwałej ekspozycji na KAF matki w przypadku parametrów metabolicznych i immunologicznych.
- już na bardzo wczesnych etapach rozwoju, bo w 25 dniu postnatalnym KAF matki prowadzi do płciowo-zależnych zmian w poziomie mRNA dla *Kiss1* w podwzgórzu oraz *Kiss1* i *Sirt1* w wątrobie potomstwa.
- długotrwała ekspozycja na KAF przed ciążą oraz w okresie prenatalnym i wczesno postnatalnym przyczynia się do opóźnienia dojrzewania płciowego potomstwa żeńskiego.
- zmiany w stosunku *Sirt1/Kiss1* w podwzgórzu i w wątrobie potomstwa mogą przyczyniać się do obserwowanych płciowo-specyficznych efektów metabolicznych i zaburzeń funkcji układu rozrodczego spowodowanych ekspozycją na KAF matki.

Ostatnią część rozprawy doktorskiej Pani mgr Juli Matuszewskiej stanowi rozdział Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski, które zostały sformułowane w sposób jasny i logiczny, 135 pozycji prawidłowo dobranej literatury, kopie oryginalnych publikacji oraz oświadczenia współautorów.

Oceniana rozprawa doktorska ma charakter opracowania, której zasadniczą część stanowią dwie oryginalne prace naukowe, które zostały już poddane wnikliwej ocenie minimum przez czterech recenzentów i dwóch edytorów czasopism o zasięgu międzynarodowym, zatem moja rola sprowadza się do omówienia ogólnych założeń przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej oraz ewentualnych uwag czy dyskusji z Autorką o wadze prac. Należy dodać, iż Doktorantka bardzo dobrze i trafnie wybrała tematycznie czasopisma o wysokich współczynnikach IF i bardzo szerokim zasięgu (cytacje publikacji *Scientific Reports* w dniu 16.11.2023, 9 razy). Wybór takich czasopism i skuteczność publikowania swoich wyników badań potwierdzają moją wysoką opinię o Doktorantce i Jej pracy doktorskiej. Wartość poznawczą wyników otrzymanych przez Panią mgr Julię Matuszewską oceniam również bardzo wysoko, o czym świadczy fakt opublikowania dwóch oryginalnych artykułów w prestiżowych czasopismach naukowych. Prace te są spójne tematycznie i metodycznie, a jako całość dostarczają istotnej wiedzy z zakresu programowania prenatalnego, tj. wpływu KAF matki na układ immunologiczny, profil metaboliczny i hormonalny oraz funkcje rozrodcze potomstwa szczurów i stanowią odpowiedź na założone przez Doktorantkę cele badawcze. Prace napisane są zrozumiale, z jasno sprecyzowanymi celami i prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. Dokumentacja wyników w postaci tabel oraz figur jest jasna i czytelna. Na pochwałę zasługują również ryciny z planem eksperymentów, które bardzo ułatwiają zrozumienie wykonanych badań. W mojej opinii cała rozprawa doktorska jest przemyślanym, konsekwentnie realizowanym pomysłem badawczym o dużej wartości poznawczej.

Uwagi i pytania

W ocenianej rozprawie trudno jest wskazać krytyczne uwagi, ponieważ prace naukowe opublikowano w prestiżowych czasopismach o międzynarodowym zasięgu i wysokich wskaźnikach bibliometrycznych,

jednak podczas analizy publikacji i opracowania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań i z obowiązku recenzenta chciałabym się nimi podzielić:

- proszę o doprecyzowanie liczby potomstwa użytego do badań w eksperymencie 1. W publikacji 1 Doktorantka pisze, że wszystkie mioty zostały ujednolicone do 8 osobników, natomiast w wykresach przedstawiono dane dla 9-13 żeńskich osobników i 7-10 męskich. W mojej opinii schemat 7 w publikacji 1 i schemat 1 w publikacji 2 mogłyby być uzupełnione o liczbę potomstwa wykorzystanego w konkretnym eksperymencie.
- strona 37 opracowania, Doktorantka pisze, że od zwierząt pobierała m.in. trzustkę oraz gonady do dalszych analiz (eksperyment 1), natomiast str. 42 pobierane tkanki to kora mózgowa, hipokamp, mózdzek, trzustka, gonady. Proszę o informację do jakich analiz wykorzystano pobrane tkanki.
- w mojej opinii w publikacjach i opracowaniu polskojęzycznym brakuje informacji o numerach katalogowych odczynników użytych do badań. W przypadku użytych testów immunoenzymatycznych ELISA istotne jest podanie zakresu krzywych standardowych, limitów czułości testów czy błędów wewnątrz- i między-seryjnych. Czy wszystkie użyte testy były specyficzne dla szczura?
- czy znany jest w literaturze skład mleka matek karmionych dietą KAF w trakcie trwania ciąży i laktacji?
- czy Doktorantka obserwowała zmiany w długości trwania estrus u samic karmionych KAF przed okresem zapłodnienia, 4 tygodnie w eksperymencie 1 i 10 tygodni w eksperymencie 2 lub inne zmiany metaboliczne np. insulinooporność?
- czy w okresie 3 tygodniowej laktacji potomstwo miało jakikolwiek dostęp do diety KAF matki?
- Doktorantka porównywała masę ciała, spożycie pokarmu i zawartość tkanki tłuszczowej samic KAT do grupy kontrolnej, a czy brała pod uwagę analizę statystyczną zmian badanych parametrów w punktach czasowych w obrębie jednej badanej grupy?
- w tabeli 3 i 4 opracowania zabrakło podania jednostek (g) w parametrze masa ciała.
- strona 67, w mojej opinii w tym podrozdziale (4.2.5) powinny znaleźć się wykresy stężeń hormonów, które Doktorantka umieściła w podrozdziale 4.2.6.
- jak wyjaśnić brak różnic w masie ciała matek utrzymywanych na KAF w porównaniu z grupą kontrolną (Tabela 3) w eksperymencie 2 z obserwowanymi zmianami (Rycina 6) w eksperymencie 1?
- czy Doktorantka rozważała analizę porównującą wyniki krótkotrwałej (eksperyment 1) z długotrwałą (eksperyment 2) ekspozycją na KAF matek np. poziomu mRNA dla *Kiss1* i *Gpr54* w podwzgórzu.
- czy Doktorantka rozważała analizę ekspresji białek dla badanych genów np. metodą Western blot w podwzgórzu i wątrobie; lub poziomu w surowicy krwi np. kisspeptyny? Moim zdaniem ciekawe byłoby także sprawdzenie zmian w poziomie czynników stanu zapalnego nie tylko w surowicy krwi lecz także w tkance tłuszczowej badanej grupy zwierząt.
- czy Doktorantka posiada wiedzę o masie pobranych tkanek np. podwzgórza czy wątroby u matek karmionych KAT lub potomstwa?
- w mojej opinii ciekawe byłoby wykonanie testów korelacji hormonów oznaczonych we krwi z ekspresją badanych genów w tkankach podwzgórza i wątroby.
- biorąc pod uwagę wyniki zmian stężeń hormonów płciowych, czy Doktorantka rozważa rozszerzenie badań o gonady? np. poziom kisspeptyny, enzymów steroidogenezy czy innych hormonów metabolicznych regulujących funkcjonowanie gonad.
- w dyskusji wyników eksperymentu 1 zabrakło szerszego wyjaśnienia jaki wpływ na funkcjonowanie organizmu mają zmiany poziomu transkryptu dla *Kiss1* i *Sirt1* w podwzgórzu podczas krótkotrwałej ekspozycji na KAF matek.
- czy Doktorantka rozważała w swoim układzie eksperymentalnym badać zmiany profilu immunologicznego na szczurach w modelu długotrwałej (eksperyment 2) ekspozycji na KAF matki?

- drobna uwaga dotyczy stosowania skrótów w opracowaniu. Skróty wprowadzone za pierwszym razem w pracy powinny być konsekwentnie stosowane, np. Doktorantka wprowadziła skrót T – testosteron, którego potem już nie używa. Znalazłam także kilka drobnych błędów językowych, np. str. 52 w podpisie Ryciny 10 zamiast n=5/sex/grupę powinno być n=5/płeć/grupę.
- str. 88 zamiast wyrazu „estrogen” Doktorantka powinna użyć wyraz „estradiol”, gdyż do estrogenów zaliczamy estron, estradiol i estriol.
- czy Doktorantka może wskazać ograniczenia lub największe wyzwania podczas prowadzenia swoich badań?
- w jaki sposób, uzyskane na szczurzym modelu wyniki, mogą być wykorzystane w przyszłości w badaniach u ludzi? Proszę o krótki komentarz o aplikacji badań uzyskanych w ramach pracy doktorskiej.
- gdyby Pani uzyskała wysokobudżetowy projekt naukowy, to jaki problem badawczy chciałaby Pani rozwiązać w przyszłości i dlaczego?

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że oceniona praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz.85 z poz.zm.) stawianym kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. W związku z powyższym przekładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny *Nauki Biologiczne* Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wniosek o dopuszczenie Pani mgr Julii Matuszewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową pracy doktorskiej, poziom przeprowadzonych analiz, nowatorskie wyniki i ich publikację w postaci dwóch oryginalnych prac w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, a także zaangażowanie Doktorantki wnosząc o wyróżnienie dysertacji. Pragnę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji dysertacja Pani mgr Julii Matuszewskiej jest wartościowym, oryginalnym dziełem naukowym, zawierającym nowatorskie wyniki, które poszerzają wiedzę z zakresu programowanie prenatalnego. Doktorantka wykazała się bardzo dobrymi umiejętnościami w planowaniu i prowadzeniu badań na szczurzym modelu, wnioskowaniu w oparciu o uzyskane wyniki oraz dużą wiedzą pozwalającą na rzeczową dyskusję z recenzentami publikacji. Przeprowadzone badania wymagały znakomitego przygotowania merytorycznego i warsztatowego. Opublikowane prace zostały bardzo dobrze przemyślane, rzetelnie zrealizowane i starannie przygotowane. Na uwagę zasługuje uzyskanie finansowania na realizowanie badań w ramach projektu NCN Preludium. Zawarte w niniejszej recenzji pytania czy komentarze nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej bardzo wysoko pracy doktorskiej lecz są zachętą do naukowej dyskusji.

Z poważaniem



dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ

Kraków, 17 listopada 2023 roku