



**Instytut Farmakologii  
im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk**

*prof. dr hab. Małgorzata Kajta*  
Kierownik Pracowni Neurofarmakologii i Epigenetyki  
Zakład Farmakologii  
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków  
e-mail: [kajta@if-pan.krakow.pl](mailto:kajta@if-pan.krakow.pl)

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**Mgr Julii Matuszewskiej**

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

### **DANE O KANDYDATCE I OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY**

Pani mgr Julia Matuszewska uzyskała tytuł magistra 3 lipca 2018 r., przy czym jednostkami organizacyjnymi nadania tytułu były: Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz Akademia Wychowania Fizycznego w Poznaniu. Autorka rozprawy nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora, a Jej dotychczasowy przebieg pracy naukowo-zawodowej obejmuje: studia doktoranckie (Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Zoologii, Pracownia Neurobiologii) i pracę na stanowisku samodzielnego referenta naukowo-technicznego (Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Zakład Patofizjologii Starzenia i Chorób Cywilizacyjnych).

Rozprawa doktorska mgr Julii Matuszewskiej powstała pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny H. Śliwowskiej (promotor) i prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Agaty Chmurzyńskiej (drugi promotor). Badania zostały wykonane w Pracowni Neurobiologii należącej do Katedry Zoologii na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Fundusze na badania pochodziły z kierowanego przez Doktorantkę, a finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, grantu PRELUDIUM na projekt pt. „Wpływ diety kafeteryjnej matki na funkcje metaboliczne i rozrodcze potomstwa szczurów: w poszukiwaniu mechanizmu” (NCN 2019/35/N/NZ9/00663). Dodatkowym wsparciem było Dofinansowanie dla Młodych Naukowców dwóch zadań badawczych w latach 2019 i 2020.

Podstawą rozprawy doktorskiej są 2 publikacje naukowe będące pracami oryginalnymi: Matuszewska i wsp. (2021) *Scientific Reports* 11, 18573 oraz Matuszewska i wsp. (2023) *Biology of Reproduction* 109, 654-668; doi.org/10.1093/biolre/ioad101. Ponadto, część wyników wchodzących w skład rozprawy przedstawiono podczas 9<sup>th</sup> *Congress of the Society for Reproductive Biology* (2021). Łączny współczynnik wpływu (*impact factor*) obu prac z uwzględnieniem roku wydania wynosi 9,157, co dowodzi renomy czasopism naukowych, w których prace zostały opublikowane. Doktorantka jest pierwszym autorem wymienionych publikacji, co jest ogólnie przyjętym w środowisku naukowym potwierdzeniem wiodącej roli w ich powstaniu. Dodatkowo wskazują na to oświadczenia określające indywidualny wkład poszczególnych współautorów w powstanie obu artykułów naukowych. Z załączonych oświadczeń wynika, że praca Doktorantki polegała nie tylko na przeprowadzeniu eksperymentów, wykonaniu analiz (ELISA, rt-PCR, statystyczna), przygotowaniu wykresów i tabel, lecz także na pisaniu manuskryptów i udziale w stworzeniu koncepcji badań.

Publikacje zostały omówione wraz z dodatkowymi wynikami w 108-stronicowym opracowaniu, w którym wyodrębniono następujące rozdziały: *Wykaz skrótów*, *Streszczenie* w j. polskim i j. angielskim, *Wstęp*, *Hipotezy i cele*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Podsumowanie i wnioski*, a także *Literatura* z wykazem 135 publikacji najważniejszych w kontekście badań Doktorantki, głównie z ostatnich lat i anglojęzycznych. W opracowaniu znalazły się również 4 tabele (m.in. z wartością odżywczą produktów diety kafeteryjnej, z zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie) i 19 rycin (3 ryciny to schematy osi podwzgórze-przysadka-gonady oraz jej regulacji m.in. przez dietę i sirtuiny, 2 ryciny to schematy doświadczeń, 14 rycin to w większości wykresy ilustrujące wyniki doświadczeń). Struktura opracowania w pełni odpowiada obowiązującym standardom. Uzupełnieniem opracowania są załączone publikacje i oświadczenia współautorów potwierdzające aktywną rolę Doktorantki w planowaniu i realizacji badań, opracowywaniu wyników oraz przygotowywaniu prac do druku.

## MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY

Wstęp opracowania liczy 13 stron i jest rzeczowym wprowadzeniem w tematykę rozprawy. Doktorantka zawarła w nim informacje na temat: otyłości, jako choroby cywilizacyjnej, programowania prenatalnego, zwierzęcych modeli otyłości oraz regulacji osi podwzgórze-przysadka-gonady. Z lektury opracowania i publikacji wynika, że oceniana rozprawa doktorska skupia się na podstawowym zagadnieniu, którym są efekty wywoływane

u potomstwa przez dietę kafeteryjną stosowaną u matek/samic szczura. Stosowanie wymienionej diety obejmuje okresy: poprzedzający ciążę, trwania ciąży i laktacji, a jej wpływ dotyczy w szczególności:

A. Zmian w zawartości tkanki tłuszczowej, profilu metabolicznym, profilu immunologicznym i ekspresji mRNA (głównie *Kiss1*, *Gpr54* i *Sirt1*) u potomstwa w 25. dniu postnatalnym.

(Matuszewska i wsp. 2021, *Sci Rep* oraz 9<sup>th</sup> Congress of the Society for Reproductive Biology, 2021)

B. Zmian w profilu metabolicznym i profilu hormonalnym potomstwa między 30 a 60. dniem postnatalnym, a także w funkcjach rozrodczych i ekspresji mRNA m.in. *Kiss1*, *Gpr54* i *Sirt1*. (Matuszewska i wsp. 2023, *Biol Reprod*)

Tematyka rozprawy jest ze wszech miar aktualna, ponieważ otyłość i zaburzenia metaboliczne są dziś rozpatrywane w kategorii chorób cywilizacyjnych. Nasilenie tych zjawisk i procesów chorobowych jest coraz częściej tłumaczone programowaniem żywieniowym lub metabolicznym płodu. Najnowsze badania dowodzą, że narażenie na wysokoenergetyczną dietę w okresie prenatalnym zwiększa ryzyko wystąpienia zaburzeń lękowych i uzależnień, zwłaszcza uzależnienia od jedzenia, co ma przypuszczalnie związek z zaburzeniem ekspresji genów w obrębie łożyska oraz zmianami w poziomie metylacji genów *Igf2* (insulinopodobny czynnik wzrostu typu 2) i *Vegf* (czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego); (Gastiazoro i wsp. 2022, *J Nutr Biochem*). Interesujące jest powiązanie diety kafeteryjnej stosowanej u ciężarnych lub karmiących samic szczura ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia u potomstwa zachowań o charakterze depresyjnym (Trujillo-Villarreal i wsp. 2021, *Trans Psychiatry*). Intrygujące są również efekty stosowania diety niskokalorycznej u potomstwa samic karmionych dietą kafeteryjną; dieta niskokaloryczna odwraca efekty wywołane dietą kafeteryjną m.in. w odniesieniu do zawartości tłuszczu w organizmie i preferencji pokarmowych, ale tylko u samców szczura (Ong i Muhlhausler, 2014, *Acta Physiol (Oxf)*). Z kolei suplementacja tauryny u samic szczura karmionych dietą kafeteryjną wywiera korzystny wpływ na potomstwo, głównie przez ograniczenie otyłości i zahamowanie szlaków związanych z metabolizmem cholesterolu i syntezy hormonów steroidowych (Cetin i wsp, 2023, *Nutr Res*).

Obecna rozprawa doktorska stanowi próbę zweryfikowania następujących hipotez badawczych, sformułowanych nieco inaczej niż w przygotowanym przez Doktorantkę opracowaniu:

- A. Dieta kafeteryjna stosowana u samic szczura w okresie poprzedzającym ciążę, podczas ciąży i laktacji (łącznie przez 10 lub 16 tygodni) oddziałuje na potomstwo w sposób specyficzny dla płci, co dotyczy: masy ciała i zawartości tkanki tłuszczowej, profilu metabolicznego, immunologicznego i hormonalnego, a także funkcji rozrodczych.
- B. Wywołane dietą kafeteryjną matki zmiany metaboliczne i hormonalne oraz zaburzenie funkcji rozrodczych u potomstwa mają związek ze szlakiem sygnałowym Sirt1/Kiss1 w podwzgórzu i/lub wątrobie.

W celu sprawdzenia słuszności powyższych hipotez, a równocześnie realizacji podjętych celów badawczych Doktorantka przeprowadziła eksperymenty na 2 modelach, którymi były: **1. Model diety kafeteryjnej krótkotrwałej** tj. stosowanej przez 10-tygodni (4 tygodnie przed ciążą, 3 tygodnie trwania ciąży, 3 tygodnie laktacji); **2. Model diety kafeteryjnej długotrwałej** tj. stosowanej przez 16-tygodni (10 tygodni przed ciążą, 3 tygodnie trwania ciąży, 3 tygodnie laktacji). Ponadto, wykorzystywała szereg adekwatnych i uznanych metod i technik badawczych, takich jak: analizy PCR w czasie rzeczywistym (mRNA *Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn*, *Tac2*), test radioimmunologiczny do oznaczania poziomu insuliny, testy enzymatyczne do oznaczania triglicerydów i cholesterolu, czy immunoenzymatyczne testy ELISA do pomiaru zawartości insuliny, estradiolu i testosteronu oraz interleukin IL-6, IL-10 i czynnika TNF- $\alpha$ . Do oszacowania zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie zastosowano jądrowy rezonans magnetyczny. Doktorantka omówiła wyniki badań w sposób uporządkowany i przemyślany, a dyskusję poprowadziła konfrontując wyniki własne z najnowszymi odkryciami w dziedzinie. Mimo pewnych trudności interpretacyjnych dotyczących ekspresji wybranych mRNA w podwzgórzu i wątrobie, Autorka rozprawy trafnie wskazała na szlak sygnałowy Sirt1/Kiss1 jako kluczowy mechanizm programowania potomstwa przez dietę kafeteryjną matek.

Na tym etapie lektury nasuwa się kilka uwag. W rozdziale opracowania dotyczącym hipotez nie została uwzględniona analiza profilu immunologicznego. W *Streszczeniu*, na str. 13 opracowania, Doktorantka podaje ramy czasowe ekspozycji na dietę kafeteryjną w tygodniach (okres poprzedzający ciążę) i dniach (okresy ciąży i laktacji), co jest nieco mylące. Odnośnie publikacji, pomimo dosyć wnikliwych poszukiwań, nie znalazłam jasnego wytłumaczenia dlaczego w okresie poprzedzającym ciążę stosowano 4- lub 10-tygodniową dietę kafeteryjną. Czy były to wartości wybrane arbitralnie? Ponadto, w opisie wyników Eksperymentu nr 1, na str. 51-52 i str. 81 opracowania, Autorka rozprawy opisuje wywołane dietą kafeteryjną matek zmiany w poziomie cholesterolu i trójglicerydów w surowicy krwi potomstwa w 25. dniu

postnatalnym. Tych wyników nie ma w publikacji Matuszewska i wsp. 2021, *Sci Rep*, która jest w opracowaniu utożsamiana z Eksperymentem nr 1. Podobnie, wymieniona publikacja nie zawiera analizy ekspresji mRNA opisanej w Eksperymentcie nr 1. Szkoda, że Doktorantka informuje dopiero na str. 77, że te dodatkowe wyniki zostały zaprezentowane podczas 9<sup>th</sup> Congress of the Society for Reproductive Biology (2021), lecz nie znajdują się np. w suplemencie pracy oryginalnej. Odnośnie Eksperymentu nr 2, w *Streszczeniu* na str. 14 Autorka rozprawy stwierdza, że „potomstwo żeńskie dodatkowo wykazywało zaburzenia w składzie ciała”, ale w *Dyskusji* na str. 85 stwierdza, że „Długotrwała ekspozycja na matczyną KAF ..... nie wpływa na skład ciała potomstwa”. Które zdanie jest prawdziwe?

Po przeanalizowaniu publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a także dodatkowych wyników opisanych w opracowaniu łącznie z Eksperymentem nr 1, za najważniejsze osiągnięcia Autorki rozprawy uważam:

1. Kompleksową charakterystykę potomstwa samic szczura karmionych dietą kafeteryjną **w sposób krótkotrwały (10 tygodni)**, zwłaszcza pod względem parametrów metabolicznych, immunologicznych i związanych z regulacją funkcji rozrodczych.

W ramach tej charakterystyki u potomstwa w 25. dniu postnatalnym krótkotrwała dieta kafeteryjna matek: **i.** Przyczynia się do spadku masy ciała oraz wzrostu zawartości tkanki tłuszczowej w organizmach potomstwa, niezależnie od płci. **ii.** Zmienia profil metaboliczny potomstwa, a ściślej przyczynia się do wzrostu poziomu glukozy, insuliny, cholesterolu i triglicerydów w krwi/surowicy krwi potomstwa obu płci. **iii.** Zmienia profil immunologiczny potomstwa przyczyniając się do wzrostu poziomu IL-6, IL-10 i TNF- $\alpha$  u samic oraz wzrostu poziomu IL-10 u samców. **iv.** Zmienia profile ekspresji mRNA *Kiss1* i *Sirt1* u potomstwa; ekspresja *Kiss1* obniża się w podwzgórzcu samców i wątrobie samic, ekspresja *Sirt1* zwiększa się w wątrobie samców.

2. Kompleksową charakterystykę potomstwa samic szczura karmionych dietą kafeteryjną **w sposób długotrwały (16 tygodni)**, zwłaszcza pod względem parametrów metabolicznych, hormonalnych i związanych z regulacją funkcji rozrodczych.

W ramach tej charakterystyki u potomstwa między 30. a 60. dniem postnatalnym długotrwała dieta kafeteryjna matek: **i.** Przyczynia się do spadku masy ciała potomstwa obu płci oraz zaburza skład ciała (tkanka tłuszczowa/ masa beztłuszczowa/ wolne płyny) w organizmach żeńskiego potomstwa. **ii.** Zmienia profil metaboliczny potomstwa, a ściślej powoduje wzrost poziomu cholesterolu i triglicerydów w surowicy krwi potomstwa obu płci. U potomstwa płci męskiej zmiany występują na wszystkich etapach rozwoju postnatalnego tj. w 40, 45 i 60 PND.

Podobnie jest u potomstwa płci żeńskiej, z wyjątkiem 30 PND, w którym nie stwierdzono zmian w poziomie triglicerydów. **iii.** Nie wpływa na poziom estradiolu u żeńskiego potomstwa, lecz opóźnia jego dojrzewanie płciowe. **iv.** Obniża ekspresję mRNA *Gpr54* w podwzgórzu i ekspresję mRNA *Sirt1* w wątrobie męskiego potomstwa (45. PND).

Na podstawie powyższych wyników można sformułować następujące wnioski:

- I. Zarówno krótkotrwała (10 tygodni), jak i długotrwała (16 tygodni) dieta kafeteryjna matek przyczynia się do spadku masy ciała potomstwa, niezależnie od płci.
- II. W modelu krótkotrwałej diety kafeteryjnej matek:
  - a. Potomstwo płci żeńskiej jest bardziej podatne na zmiany profilu metabolicznego (większy wzrost poziomu insuliny) i immunologicznego (wzrost poziomu wszystkich badanych markerów) niż potomstwo płci męskiej.
  - b. Analiza ekspresji wybranych mRNA (*Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn*, *Tec2*) sugeruje, że tylko potomstwo męskie jest podatne na zmiany ekspresji mRNA *Kiss1* w podwzgórzu. Natomiast zmiany ekspresji mRNA w wątrobie dotyczą *Kiss1* i *Sirt1*, odpowiednio, u potomstwa żeńskiego i męskiego.
- III. W modelu długotrwałej diety kafeteryjnej matek:
  - a. Potomstwo męskie jest bardziej podatne na zmiany profilu metabolicznego niż potomstwo żeńskie, co przejawia się podwyższonym poziomem cholesterolu i triglicerydów w surowicy krwi na wszystkich etapach rozwoju postnatalnego tj. w 40, 45 i 60 PND.
  - b. Analiza ekspresji wybranych mRNA (*Kiss1*, *Gpr54*, *Sirt1*, *Pdyn*, *Tec2*) sugeruje, że tylko potomstwo męskie jest podatne na zmiany ekspresji *Gpr54* w podwzgórzu i *Sirt1* w wątrobie. Co interesujące, w miarę rozwoju, potomstwo obu płci wykazuje wzrost ekspresji mRNA *Sirt1* w podwzgórzu oraz spadek ekspresji mRNA *Sirt1* w wątrobie.

## PODSUMOWANIE i WNIOSEK KOŃCOWY

Reasumując, oceniana rozprawa doktorska dostarczyła oryginalnych danych na temat programowania potomstwa dietą kafeteryjną matek stosowaną zarówno w okresie poprzedzającym ciążę, jak i podczas ciąży i karmienia potomstwa. Zaobserwowane przez Doktorantkę efekty oddziaływania diety matek na potomstwo mają dużą wartość poznawczą

i mogą być wykorzystane w profilaktyce i terapii otyłości względnie zaburzeń rozwojowych układu rozrodczego. Wprawdzie pełna standaryzacja diety kafeteryjnej jest niezwykle trudna, to jednak Autorka rozprawy z powodzeniem podjęła badania w tym obszarze nauki. Identyfikacja szlaku sygnałowego Sirt1/Kiss1 jako mechanizmu, za pośrednictwem którego dieta matki może przypuszczalnie wywierać wpływ na status metaboliczny i hormonalny potomstwa oraz regulować jego funkcje rozrodcze jest niezwykle cennym odkryciem.

Rozprawa doktorska **mgr Julii Matuszewskiej pt. „Wpływ diety kafeteryjnej matki na układ immunologiczny, profil metaboliczny i hormonalny oraz funkcje rozrodcze potomstwa szczurów”** spełnia wymagania określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Wnioskuje do Rady Naukowej Dyscypliny *Nauki biologiczne* Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr Julii Matuszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 23 listopada 2023 r.



Małgorzata Kajta

