



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

prof. dr hab. Małgorzata Kajta
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki
Zakład Farmakologii
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
e-mail: kajta@if-pan.krakow.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr. Kamila Ziarniaka

„Neurony KNDy a dysfunkcje układu rozrodczego szczurzy z indukowaną eksperymentalnie otyłością i cukrzyca typu 2”

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY

Rozprawa doktorska mgr. Kamila Ziarniaka powstała pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny H. Śliwowskiej (promotor) i dr. Pawła A. Kołodziejewskiego (promotor pomocniczy) w Pracowni Neurobiologii należącej do Katedry Zoologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Środki finansowe na badania pochodziły z grantu OPUS Narodowego Centrum Nauki oraz polsko-węgierskiego grantu mobilnościowego.

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowią 2 prace oryginalne opublikowane w czasopismach *Journal of Neuroendocrinology* (Ziarniak i wsp. 2018) i *Neuroscience* (Ziarniak i wsp. 2020) o łącznym współczynniku wpływu (impact factor; IF) zawierającym się między 6,096 (IF z danego roku) a 6,763 (5-letni IF). Wspomniane czasopisma cieszą się dużym uznaniem naukowców, zwłaszcza neurobiologów. Doktorant jest pierwszym autorem wymienionych publikacji, co dowodzi jego wiodącej roli w ich powstaniu.

Do prac oryginalnych zostało dołączone liczące 99 stron omówienie, które zawiera typowe dla tego rodzaju opracowań rozdziały: Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie w j. polskim i angielskim, Wstęp, Hipotezy i cele badań, Materiały i metody badawcze, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie dyskusji, Wnioski i Literatura. Nowym elementem omówienia prac

wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest podrozdział: Proponowane kierunki dalszych badań. W wykazie zacytowanego piśmiennictwa znajdują się 254 publikacje, głównie z ostatnich lat i anglojęzyczne, co wskazuje na bardzo dobrą orientację Doktoranta w najnowszej literaturze fachowej. Omówienie prac oryginalnych zostało uzupełnione przez oświadczenia współautorów, którzy potwierdzają znaczący udział Doktoranta w opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu doświadczeń i pomiarów, analizie statystycznej wyników oraz przygotowaniu wstępnych wersji manuskryptów.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest próbą identyfikacji mechanizmów, za pośrednictwem których otyłość i cukrzyca typu 2: i. oddziałują na oś podwzgórze – przysadka - jajniki i regulowane przez nią funkcje rozrodcze, a także ii. wpływają na liczbę komórek jądra łukowatego podwzgórze wykazujących ekspresję kisspeptyny, neurokininy B i dynorfiny A tj. liczbę komórek KNDy. W celu określenia roli tła hormonalnego w regulacji liczby neuronów KNDy zastosowano procedurę ovariectomii i/lub podania estradiolu i progesteronu, zarówno wobec zwierząt z otyłością, jak i cukrzycą typu 2. Zastosowane układy badawcze, analizy i pomiary posiadają właściwe kontrole i punkty odniesienia, co dowodzi rzetelnego przygotowania Doktoranta do prowadzenia badań. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono na samicach szczura (modele otyłości i cukrzycy typu 2, ovariectomia, podanie steroidów), zaś analizy wykonano *in vivo* (m.in. ocena cyklu rujowego, dootrzewnowy test tolerancji glukozy) względnie *ex vivo* (m.in. immunohistochemiczna lokalizacja neuronów KNDy, wyznaczenie profili metabolicznych i hormonalnych), co nawet przy zachowaniu dużej ostrożności interpretacyjnej dowodzi wysokiej wartości translacyjnej badań.

Podjęcie przez Doktoranta tematyki otyłości i cukrzycy typu 2 w kontekście rozrodczości samic i neuronów KNDy stwarza perspektywę pełniejszego poznania etiologii zaburzeń funkcjonowania żeńskiego układu rozrodczego. O ile rola neuronów KNDy w regulowaniu funkcji rozrodczych wydaje się ustalona, weryfikacja udziału tych neuronów w odpowiedzi na zaburzenia metaboliczne związane z otyłością i cukrzycą typu 2 wymagała jeszcze do niedawna intensywnych badań. Dopiero prace Zespołu, w którym powstała oceniana rozprawa doktorska, dostarczyły dowodów, że samce szczura z wywołaną eksperymentalnie cukrzycą, ale nie otyłością, mają odmienny poziom neuronów ekspresujących kisspeptynę i neurokininę B w jądrze łukowatym podwzgórze (Dudek i wsp. 2017, *J Neuroendocrinol*).

Badania Zespołu wskazały również na zaburzenie równowagi w ekspresji Kiss1 i GPR54 jako możliwą przyczynę dysfunkcji metabolicznych i rozrodczych u szczurów z otyłością i cukrzycą (Dudek i wsp. 2016; *Neuropeptides*).

Prace oryginalne składające się na niniejszą rozprawę doktorską są naturalnym dopełnieniem zacytowanych wyżej publikacji. Wskazują bowiem na istotne różnice dotyczące wpływu otyłości i cukrzycy typu 2 na funkcje rozrodcze i liczbę neuronów KNDy u samców i samic szczura. Obecna rozprawa doktorska dowodzi, że otyłość i cukrzyca typu 2 przyczyniają się do rozregulowania cyklu estralnego samic szczura, ale nie zmieniają poziomu ekspresji neuronów KNDy w jądrze łukowatym podwzgórza, niezależnie od statusu hormonalnego (samice w diestrus, samice po owariektomii). Dostrzegalne są zaledwie niewielkie różnice w rozmieszczeniu tych neuronów (Ziarniak i wsp. 2018; *J Neuroendocrinol*). W nawiązaniu do tego wyniku zastanawia mnie czy dynamika zmian ekspresji neuronów KNDy jest taka sama u samców i samic ssaków? Innymi słowy, czy istnieje możliwość, że u samic z otyłością lub cukrzycą typu 2 poziom ekspresji neuronów KNDy zmienia się bardziej lub mniej dynamicznie niż u samców obciążonych tymi samymi zaburzeniami metabolicznymi? Nieco światła rzuca na ten problem publikacja Kunimura i wsp. 2017; *Neurobiol Aging* wskazując na odmienne profile ekspresji neuronów KNDy u starzejących się samic i samców gryzoni. A może, jak sugeruje to wynik uzyskany przez Autora rozprawy, poziom ekspresji neuronów KNDy w jądrze łukowatym jest taki sam u samic z otyłością, cukrzycą typu 2 i samic bez zaburzeń metabolicznych, a różnice dotyczą tylko pewnych obszarów tej części podwzgórza. I jeszcze jedno pytanie, czy sąsiadujące ze sobą neurony KNDy mogą się od siebie różnić pod względem poziomów ekspresji kisspeptyny, neurokininy B i dynorfiny A?

Zważywszy że zaburzenia metaboliczne i bezpłodność to poważne problemy społeczne i kliniczne, uważam tematykę ocenianej rozprawy doktorskiej za aktualną i ze wszech miar pożądaną w badaniach podstawowych. Wykonane przez Doktoranta badania miały bowiem na celu ustalenie stopnia, w jakim eksperymentalnie indukowana otyłość i cukrzyca typu 2 wpływają na:

- i. regularność cyklu płciowego,
- ii. profil metaboliczny (cholesterol całkowity, triglicerydy),
- iii. profil hormonalny (insulina, leptyna, E2),
- iv. liczbę neuronów KNDy w jądrze łukowatym podwzgórza,

a także

- v. profil metaboliczny samic po owariektomii (cholesterol całkowity, triglicerydy),
- vi. profil hormonalny samic po owariektomii (insulina, leptyna, E2),
- vii. liczbę neuronów KNDy w jądrze łukowatym podwzgórza samic po owariektomii.

Chociaż Doktorant formułował hipotezy dość ostrożne, ich weryfikacja była okupiona żmudnymi badaniami, których stopień trudności i zaawansowania wzrastał w miarę wprowadzania kolejnych modeli i procedur, tj. a. modelu otyłości w oparciu o dietę wysokotłuszczową, b. modelu cukrzycy typu 2 wykorzystującego dietę wysokotłuszczową do wywołania otyłości i streptozotocynę w celu uszkodzenia komórek β wysp trzustkowych, a także c. procedury owariektomii w połączeniu z podaniem steroidów w celu ujednoczenia tła hormonalnego. Podziwiam benedyktyńską cierpliwość, która musiała towarzyszyć kolejnym doświadczeniom, pomiarom i analizom, zwłaszcza ilościowej analizie neuronów wykazujących równocześnie ekspresję kisspeptyny, neurokininy B i dynorfiny A. W tym kontekście zastanawia mnie czy użycie do analiz mikroskopu konfokalnego mogłoby dostarczyć dodatkowych informacji np. na temat poziomu ekspresji markerów KNDy w pojedynczych neuronach i w ten sposób umożliwić pogłębioną analizę neuronów KNDy?

Podobnie, jak to zostało przedstawione w opisie publikacji stanowiących podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej, spośród wyników uzyskanych przez Doktoranta za najważniejsze osiągnięcia uważam wykazanie, że:

1. Otyłość i cukrzyca typu 2 zaburzą cykl estralny szczurzym, co dotyczy głównie faz proestrus i diestrus.
2. Samice szczura z wywołaną eksperymentalnie otyłością i cukrzycą typu 2 mają zmienione profile metaboliczne i hormonalne; m.in. podwyższone stężenia E2 i glukozy, obniżone stężenie insuliny.
3. Otyłość i cukrzyca typu 2 nie zmieniają ekspresji neuronów KNDy w jądrze łukowatym podwzgórza samic szczura.
4. W porównaniu z samcami (wcześniejsze prace Zespołu, w którym powstała oceniana rozprawa doktorska), samice szczura są znacznie mniej podatne na zmiany ekspresji neuronów KNDy w odpowiedzi na cukrzycę typu 2 (niewielkie zmiany w rozmieszczeniu neuronów, ale nie w ich liczbie).

5. Zabieg owariektomii zmienia profile metaboliczne i hormonalne u samic szczura obciążonych otyłością i cukrzycą typu 2; u samic z otyłością: podwyższone stężenia leptyny, cholesterolu i triglicerydów, u samic z cukrzycą typu 2: podwyższone stężenia leptyny, cholesterolu, triglicerydów i glukozy oraz obniżony poziom insuliny i glukagonu.
6. Zabieg owariektomii nie wpływa istotnie na liczbę neuronów KNDy w jądrze łukowatym podwzgórza samic szczura, niezależnie od rodzaju zaburzeń metabolicznych.

Tegoroczna publikacja Minabe i wsp. (2021; *Peptides*) potwierdza niektóre obserwacje Doktoranta dowodząc, że dieta wysokotłuszczowa obniża ekspresję genów kodujących *Kiss1* i *Pdyn* w podwzgórzu szczurów, głównie samców. Natomiast u większości samic dieta wysokotłuszczowa nie wpływa na ekspresję tych genów, co koreluje z brakiem zmian w liczbie neuronów KNDy wykazanych przez Doktoranta. Co więcej, dieta wysokotłuszczowa zaburza cykl estralny samic, ale nie zmienia poziomu LH u samców. Tylko u niektórych samic z zaburzonym w wyniku stosowanej diety cyklem estralnym występuje obniżony poziom LH i downregulacja *Kiss1*, podobnie jak u samców. Okazuje się więc, że publikacja Ziarniak i wsp. (2018) *J Neuroendocrinol* stanowiąca część ocenianej rozprawy doktorskiej stała się inspiracją dla innych badaczy. Jednak wyniki zawarte w rozprawie dotyczące samic po owariektomii (publikacja Ziarniak i wsp. 2020; *Neuroscience*) stoją częściowo w opozycji do pracy Nakao i wsp. (2018; *Neurosci Lett*), wg której liczba neuronów KNDy w podwzgórzu samic szczura Zucker *fatty* (model otyłości) po owariektomii jest obniżona. Możliwe, że głównym powodem tej różnicy jest zastosowany model i punkt odniesienia, jakim w przypadku cytowanej pracy były samice szczura szczepu Zucker *lean*, a nie samice Wistar jak to miało miejsce w publikacji Autora rozprawy.

PODSUMOWANIE i WNIOSEK KOŃCOWY

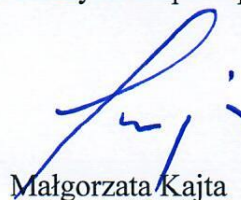
Otyłość, cukrzyca typu 2 i bezpłodność to choroby cywilizacyjne, z którymi z różnym skutkiem zmagają się współczesna medycyna. Poznanie mechanizmów, za pośrednictwem których status metaboliczny oddziałuje na neurony KNDy, zwłaszcza w przebiegu otyłości i cukrzycy typu 2, może służyć poprawie farmakoterapii zaburzeń funkcji rozrodczych. Co więcej, identyfikacja prawidłowości leżących u podstaw wzajemnych interakcji między statusem metabolicznym, statusem hormonalnym i ekspresją neuronów KNDy w podwzgórzu

ssaków może stanowić punkt wyjścia do opracowania nowych leków, które oprócz wspomnianej już farmakoterapii zaburzeń funkcji rozrodczych, mogą być użyteczne m.in. w leczeniu zaburzeń odżywiania czy zapobieganiu wywołanych dysfunkcją osi podwzgórze – przysadka – gonady epizodów sercowo-naczyniowych i osteoporozy. Ważnym elementem tego rodzaju badań będzie również ocena statusu epigenetycznego neuronów KNDy, szczególnie w odpowiedzi na dietę.

Rozprawa doktorska Pana mgr. Kamila Ziarniaka jest wysoce oryginalna, co zostało już potwierdzone przez opublikowanie wyników badań w uznanych czasopismach naukowych. Przedstawione wyniki badań posiadają dużą wartość translacyjną, ponieważ zostały uzyskane z wykorzystaniem zaawansowanych modeli chorób cywilizacyjnych i zachowaniem najwyższych standardów. Doktorant umiejętnie połączył wiedzę i kompetencje z zakresu neuroendokrynologii doświadczalnej, biologii rozrodu, biochemii i immunohistochemii, by w kompleksowy sposób zweryfikować postawioną hipotezę badawczą i udowodnić, że zmiany w ekspresji neuronów KNDy w podwzgórzach gryzoni laboratoryjnych są w większym stopniu uzależnione od płci niż od statusu metabolicznego. Status hormonalny samic szczura (samice z regularnym cyklem estralnym, samice po owariektomii) nie ma w tym kontekście znaczenia. W mojej opinii rozprawa doktorska mgr. Kamila Ziarniaka przewyższa zwyczajowe wymogi prac doktorskich, co skłania mnie do złożenia wniosku o wyróżnienie rozprawy.

Rozprawa doktorska **mgr. Kamila Ziarniaka pt. „Neurony KNDy a dysfunkcje układu rozrodczego szczuryc z indukowaną eksperymentalnie otyłością i cukrzycą typu 2”** spełnia wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w zakresie Sztuki (Dz. Ustaw z 2003 r., Nr 65 poz. 595., Dz. Ustaw z 2005 r., Nr 164, poz. 1365, Dz. Ustaw z 2011 r., Nr 84, poz. 455). Wniosuję o dopuszczenie mgr. Kamila Ziarniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 20 czerwca 2021 r.



Małgorzata Kajta