

Dr hab. Marek Skrzypski
Katedra Fizjologii, Biochemii
i Biostruktury Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Ul. Wołyńska 35
60-637 Poznań

Poznań, 20.08.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kingi Aleksandry Orzechowskiej pt.
*Wpływ chemeryny na profil transkryptomyczny i proteomiczny błony śluzowej
macicy świni domowej (Sus scrofa domestica L.) w okresie implantacji***

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została zrealizowana pod opieką Pani prof. dr hab. Niny Smolińskiej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Dysertacja składa się z cyklu dwóch stanowiących spójną całość artykułów opublikowanych w 2022 roku:

1. Orzechowska K, Kopij G, Paukšto L, Dobrzym K, Kieżun M, Jastrzebski J, Kamiński T, Smolińska N. Chemerin effect on transcriptome of the porcine endometrium during implantation determined by RNA-Sequencing. (2022) Biology of Reproduction. DOI: 10.1093/biolre/ioac063
2. Orzechowska K, Dobrzyń K, Kieżun M, Malinowska A, Świdorska B, Kamiński T, Smolińska N. Chemerin Effect on the Endometrial Proteome of the Domestic Pig during Implantation Obtained by LC-MS/MS Analysis. (2022) Cells. DOI: 10.3390/cells11071161

Sumaryczny IF publikacji (w roku opublikowania) wynosi 10,885, a łączna liczba punktów MEiN to 340. Pani mgr Kinga Orzechowska jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach, a jej udział w powstawaniu prac był wiodący i zgodnie z załączonymi oświadczeniami składało się na niego opracowanie koncepcji i metodyki badań, wykonanie badań laboratoryjnych, opracowanie, zarządzanie oraz walidacja wyników. Ponadto, co ważne Doktorantka przygotowała pierwsze wersje manuskryptów oraz udzieliła odpowiedzi na recenzje tych prac. Dopełnieniem części dysertacji składającej się publikacji jest dołączone opracowanie w języku polskim.

Tematem badawczym podjętym podczas realizacji rozprawy doktorskiej było określenie wpływu białka chemeryny na zmiany transkryptomiczne oraz proteomiczne w błonie śluzowej macicy świni domowej w okresie implantacji. Badania wykonano w układzie *in vitro*. Chemeryna jest zaliczanym do adipokin białkiem odkrytym niemal 20 lat temu dlatego jej rola w organizmie jest dosyć dobrze scharakteryzowana przez opublikowane do tej pory dane eksperymentalne. Warto zaznaczyć, że dostępne dane literaturowe wykazały udział chemeryny w procesach związanych z funkcjonowaniem układu rozrodczego takimi jak angiogeneza oraz steroidogeneza w jajnikach oraz dojrzewanie oocytów. Co ważne, wcześniejsze badania wykazały obecność chemeryny oraz jej receptorów w macicy. Ponadto dowiedziono, że u świni poziom chemeryny w płynie macicznym wzrasta w okresie implantacji. Wyniki te dostarczyły cennych informacji pomocnych w formułowaniu oraz uzasadnieniu postawionych hipotez badawczych, nie ujmując w żadnym stopniu nowatorskiemu charakterowi planowanych badań.

Jak wspomniałem powyżej rozprawę doktorską stanowią przede wszystkim dwie opublikowane oryginalne prace twórcze, które mając na uwadze wysoką rangę czasopism, w których się ukazały podległy już wnikliwej i merytorycznej recenzji. Dlatego też swoją ocenę skupię przede wszystkim na wchodzącym w skład rozprawy opracowaniu w języku polskim, metodyce badań, założeniach pracy oraz uzyskanych wynikach.

Uważam, że opracowanie polskojęzyczne zostało należycie i rzetelnie przygotowane. Rozpoczyna je wstęp, w którym Doktorantka w wyczerpujący sposób charakteryzuje chemerynę jej receptory oraz rolę systemu chemerynowego w regulacji wybranych procesów biologicznych, w tym biologii układu rozrodczego. Kolejną częścią opracowania jest postawienie hipotezy badawczej oraz sformułowanie zrealizowanych w dwóch publikacjach celów badawczych. Istotną część pracy stanowi opis metod, który w przeważającej części jest wyczerpujący, a ewentualne uwagi przedstawię poniżej. W tym momencie warto również podkreślić, że warsztat metodyczny Doktorantki jest bardzo rozbudowany i będzie za pewne bardzo dobrą postawą kolejnych sukcesów naukowych. Następnie Doktorantka opisuje wyniki opublikowane w artykułach. Za najważniejsze osiągnięcia wykazane w pierwszej publikacji należy uznać, wykazanie zmian w ekspresji w przypadku 130 genów, zaobserwowano również zmiany w ekspresji 12 lncRNAs. Kolejnym cennym wynikiem jest identyfikacja 386 transkryptów w obrębie, których wykazano miejsca

splicingowe o zmiennym profilu ekspresji. Co ważne nie ograniczono się jedynie do metody Sekwencjonowania Następnej Generacji, a część wyników z powodzeniem potwierdzono metodą PCR w czasie rzeczywistym. Jeśli chodzi o drugą z prac to stanowi ona bardzo cenne uzupełnienie rezultatów pierwszej publikacji, gdyż dotyczy zmian w globalnej produkcji białek scharakteryzowanej za pomocą metody Chromatografii Cieczowej Sprzężonej z Tandemową Spektrometrią mas (LC-MS/MS). Podobnie, jak w przypadku pierwszej z publikacji tak i tutaj Doktorantka nie ograniczyła się do jednej metody, ponieważ zmiany w poziomie produkcji wybranych białek potwierdzono techniką Western blot. W pracy tej dowiedziono zmian w poziomie produkcji 352 białek, które powiązano z 47 adnotacjami funkcjonalnymi. Przeprowadzone analizy ontologiczne genów oraz białek dostarczyły przekonujących dowodów na udział chemeryny w regulacji takich procesów jak migracja i adhezja komórek, angiogeneza oraz odpowiedź immunologiczna. Ponadto dowiedziono potencjalnego wpływu chemeryny na w syntezie hormonów steroidowych oraz odpowiedzi komórek na progesteron. Całość opracowania w języku polskim uzupełniają rozdziały *Ograniczenia badań* oraz *Podsumowanie i wnioski końcowe*. Uważam, rozdział *Ograniczenia badań* jest cenną częścią opracowania ponieważ świadczy dociekliwości naukowej, świadomości wykonania kolejnych badań oraz interpretacji wyników co jest dowodem na dojrzałość naukową mgr Kingi Orzechowskiej. Z mojego punktu widzenia zabrakło chociaż skrótowej dyskusji wyników. Mam jednak świadomość, że zostało to wyczerpująco wykonane w załączonych publikacjach, które stanowią najważniejszą część rozprawy doktorskiej. Jeśli chodzi o dobór literatury uważam, że zarówno w przypadku opracowania po polsku jak i dwóch publikacji jest on stosowny i aktualny. Poniżej przedstawię swoje komentarze i pytania do Doktorantki, które nasunęły mi się podczas lektury polskojęzycznego opracowania oraz cyklu publikacji:

1. Doktorantka w opisie metodyki podaje, że *Sukces zapłodnienia oraz stopień zaawansowania ciąży potwierdzono poprzez obecność i ocenę morfologiczną zarodków*. Na czym polegała ocena morfologiczna zarodków odpowiadająca 15-16 dniu ciąży? Czy sukces zapłodnienia mierzony był poprzez ilość zapłodnionych zarodków oraz czy był zbliżony u wszystkich loh? Czy w doświadczeniu określono kryteria wykluczenia zwierząt z doświadczenia, jakim np. była liczba zarodków w macicy?

2. Dlaczego do wyboru skrawków zdecydowano się wykorzystać tkanki ze środkowego fragmentu rogu macicy? Czy fragmenty pobierano z miejsca implantacji zarodka?
3. Jak wspomniałem powyżej ważnym elementem rozprawy jest opis ograniczeń przeprowadzonych badań. Doktorantka trafnie wspomina, że obserwacje dotyczą jedynie warunków *in vitro*. W przeprowadzonym badaniu wykorzystano jedynie młode zwierzęta. Czy doktorantka mogłaby się odnieść na temat swoich przemyśleń dotyczących wpływu chemeryny na ekspresję genów i produkcję białek u wieloródek?
4. Czy doktorantka mogłaby uzasadnić wybór czasu inkubacji (24 godziny) z badanym hormonem?
5. Czy Doktorantka planuje kolejne badania? Jeśli tak to czy mogłaby scharakteryzować jakie kroki podejmie w celu dalszej charakterystyki roli chemeryny w regulacji implantacji i rozwoju zarodka?
6. Czy dostępne są jakieś dane na temat profilu ekspresji receptorów chemeryny macicy w trakcie implantacji zarodka?
7. Rozumiem, że podane w opisie hodowli komórkowej stężenie tlenu (95%) jest pomyłką, a Doktorantce chodziło o stężenie powietrza.
8. Z punktu widzenia czytelnika polskojęzycznego opracowani, uważam, że powinien się w nim znaleźć wykaz skrótów.

Podsumowując recenzję uważam, że przeprowadzone badania są nowatorskie oraz dostarczyły cennych informacji na temat potencjalnej roli hormonu chemeryny w regulacji funkcji rozrodczych, w szczególności w kontekście zmian dotyczących procesów metabolicznych oraz odpornościowych podczas implantacji zarodka. Na uznanie zasługuje kompleksowość przeprowadzonych eksperymentów ponieważ wpływ chemeryny badano na poziomie RNA ale również białka, co jest cennym wzbogaceniem wyników. Dlatego też wartość poznawcza uzyskanych wyników jest bardzo wysoka. Mając na uwadze, że problemy związane z rozrodem dotyczą nie tylko zwierząt hodowlanych, ale są coraz powszechniejszym zjawiskiem w medycynie ludzkiej uważam, że obserwacje te są bardzo cenne i z pewnością doczekają się kontynuacji włączając badania *in vivo*.

Wniosek końcowy

Podsumowując powyższe uwagi w moim przekonaniu rozprawa spełnia wszystkie warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego też zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi A. Orzechowskiej oraz dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na wysoką wartość poznawczą rozprawy, potwierdzoną publikacjami w cieszącym się dużym uznaniem czasopismach naukowych wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Marek Słysz