

Dr hab. Anna Szóstek-Mioduchowska
Zakład Immunologii i Patologii Rozrodu
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Olsztyn, 26.08.2022

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

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Aleksandry Orzechowskiej pt. *„Wpływ chemeryny na profil transkryptomiczny i proteomiczny błony śluzowej macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie implantacji”* wykonana została pod opieką Promotora naukowego Pani Prof. dr hab. Niny Smolińskiej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Badania do pracy realizowano w ramach projektu OPUS13 (2017/25/NZ9/00040) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz Programu Rozwojowego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie: POWR.03.05.00-00-Z310/17 współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Podstawą ocenianej pracy doktorskiej są dwie spójne tematycznie, oryginalne publikacje naukowe oraz poprzedzające je zwięzłe, polskojęzyczne opracowanie w formie manuskryptu. Publikacje ukazały się w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR) w roku 2022. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską:

1. **Orzechowska K**, Dobrzyń K, Kieżun M, Malinowska A, Świdarska B, Kamiński T, Smolińska N. Chemerin Effect on the Endometrial Proteome of the Domestic Pig during Implantation Obtained by LC-MS/MS Analysis. *Cells*. 2022 Mar 30;11(7):1161. (IF=6,663; MEiN=140)
2. **Orzechowska K**, Kopij G, Paukšto L, Dobrzyń K, Kieżun M, Jastrzebski J, Kamiński T, Smolińska N. Chemerin effect on transcriptome of the porcine endometrium during implantation determined by RNA-sequencing. *Biol Reprod*. 2022 Mar 25: ioac063. (IF=4,285; MEiN=200)

Łączny współczynnik oddziaływania (IF) czasopism, w których opublikowano prace stanowiące rozprawę doktorską, wynosi 10,885, natomiast suma punktów MEiN to 340.

W obu publikacjach Pani mgr Kinga Aleksandra Orzechowska jest pierwszym autorem, a Jej znaczący wkład w ich powstanie nie budzi wątpliwości. Zgodnie z dołączonymi do rozprawy doktorskiej oświadczeniami wszystkich współautorów publikacji, udział Doktorantki w każdej z prac był wiodący i polegał na opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, analizie i zarządzaniu danymi, opracowaniu i walidacji wyników, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu i udzieleniu odpowiedzi recenzentom podczas procesu publikacji. Uważam jednak, że wskazane byłoby podanie udziału procentowego zaangażowania Autorki i współautorów w powstanie prac.

Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej są spójne tematycznie i skupiają się wokół wpływu chemeryny na profil transkryptomiczny i proteomiczny błony śluzowej macicy świni domowej w okresie zagnieżdżenia zarodka. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest w pełni uzasadniona i jest kontynuacją tematyki badawczej Promotora pracy prof. dr hab. Niny Smolińskiej oraz Zespołu badawczego, w którym praca była realizowana.

Głównym tematem publikacji, będących podstawą rozprawy doktorskiej, jest wpływ chemeryny na profil transkryptomiczny i proteomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie zagnieżdżenia zarodka. Chemeryna jest hormonem wydzielanym przede wszystkim przez tkankę tłuszczową, który odgrywa rolę w regulacji homeostazy energetycznej, a także w reakcji zapalnej oraz reakcji na stres. Białko to wiąże się z trzema receptorami należącymi do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G: receptorem 1 podobnym do chemokin (CMKLR1), receptorem 1 związanym z białkiem G (GPR1) oraz receptorem 2 podobnym do chemokin (CCRL2). Ekspresja chemeryny i jej receptorów występuje w wielu tkankach u ludzi, gryzoni, bydła i świń. Wyniki badań wskazują na ważną rolę chemeryny w układzie rozrodczym w procesach, takich jak: angiogeneza, steroidogeneza, apoptoza, proliferacja komórek i dojrzewanie oocytów w jajniku u tych gatunków. Wykazano ekspresję chemeryny w strukturach osi podwzgórze-przysadka-gonady oraz w macicy i zarodkach świni. Stężenie chemeryny w płynie macicznym wzrasta w 15 dniu ciąży w stosunku do dnia 12-13 ciąży u świni. Ekspresja receptora CCRL2 na poziomie białka zwiększa się w 15-16 dniu ciąży w błonie śluzowej macicy świni, co sugeruje ważną rolę chemeryny w procesach zachodzących w okresie zagnieżdżenia zarodka. Jednakże rola chemeryny w tym procesie nie

została do tej pory opisana. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Aleksandry Orzechowskiej ma na celu poznanie wpływu chemeryny na ekspresję białek i genów w okresie zagnieżdżenia zarodka, a tym samym dzięki analizie bioinformatycznej określenie jej roli w procesach zachodzących w tym ważnym okresie ciąży. Uzyskane wyniki mają więc nie tylko znaczenie poznawcze, ale również praktyczne, biorąc pod uwagę, wysoką śmiertelność zarodków (20-30%) w okresie okołoimplantacyjnym u świń. Dokładne zrozumienie molekularnych aspektów komunikacji matki i zarodka w okresie zagnieżdżenia zarodka oraz określenie roli hormonów wytwarzanych przez tkankę tłuszczową może odgrywać rolę w ograniczeniu zjawiska wczesnej zamieralności zarodków, a tym samym zwiększyć ilość żywych urodzeń, co ma duże znaczenie ekonomiczne w hodowli tego gatunku. Ponadto uzyskane wyniki są niezwykle ciekawe w kontekście powiązania roli czynników uwalnianych przez tkankę tłuszczową z procesami rozrodczymi.

Celem pierwszej publikacji stanowiącej rozprawę doktorską, opublikowanej w *Biology of Reproduction*, było określenie wpływu chemeryny na profil transkryptomyczny błony śluzowej macicy świni w okresie wczesnej ciąży. Skrawki błony śluzowej macicy pobrane od loszek będących w 15-16 dniu ciąży hodowano w warunkach *in vitro* z dodatkiem chemeryny w stężeniu 400 ng/ml. Następnie w zebranych materiale określono profil transkryptomiczny przy użyciu metody sekwencjonowania następnej generacji. W odpowiedzi na działanie chemeryny w warunkach *in vitro* zidentyfikowano 130 genów wykazujących zmiany ekspresji, w tym 58 genów wykazało wzrost ekspresji, natomiast 72 geny wykazały obniżenie ekspresji. Geny zostały przypisane do 73 adnotacji funkcjonalnych. Wykazano również 12 długich, niekodujących sekwencji RNA o zmienionej ekspresji. Uzyskane wyniki były walidowane poprzez wykonanie analizy qPCR m.in. dla następujących genów: *PRL*, *CGA*, *IL7R*, *NAMPT*, *ITGB8*, *FSHβ*, *GHI*, *LAMA3*. Uzyskane wyniki badań sugerują, że chemeryna wpływa na ekspresję genów zaangażowanych w takie procesy jak migracja i adhezja komórek, angiogeneza, reakcje zapalne oraz steroidogeneza w błonie śluzowej macicy świni podczas zagnieżdżenia zarodka. Wskazuje to na jej potencjalną rolę jako czynnika regulującego poprawny przebieg procesu zagnieżdżenia zarodka.

Celem drugiej publikacji, stanowiącej rozprawę doktorską, opublikowanej w *Cells*, było określenie wpływu chemeryny na profil białkowy błony śluzowej macicy świni

w okresie wczesnej ciąży. Skrawki błony śluzowej macicy loszek będących w 15-16 dniu ciąży hodowano w warunkach *in vitro* z dodatkiem chemeryny w stężeniu 400 ng/ml. Następnie w zebranych materiale określono profil proteomiczny przy użyciu metody chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). W odpowiedzi na działanie chemeryny w warunkach *in vitro* zidentyfikowano 352 białka wykazujące zmienną ekspresję, w tym 164 białka wykazały wzrost ekspresji, natomiast 188 białek wykazało obniżenie ekspresji w wyniku podania chemeryny. Białka zostały powiązane z 47 adnotacjami funkcjonalnymi. Uzyskane wyniki były walidowane poprzez wykonanie analizy Western-blot dla następujących białek: IFIT5, TGF- β 1, ACO1 oraz PGRMC1. Uzyskane wyniki badań sugerują, iż chemeryna wpływa na ekspresję białek zaangażowanych w takie procesy jak proliferacja, migracja i inwazja komórek, angiogeneza, reakcje zapalne oraz wrażliwość na progesteron w błonie śluzowej macicy świni podczas zagnieżdżenia zarodka. Wskazuje to na potencjalną rolę chemeryny jako czynnika regulującego prawidłowy przebieg procesu zagnieżdżenia zarodka.

Dane przedstawione w obu publikacjach mają charakter nowatorski. Ich analiza była dla mnie satysfakcjonująca. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską były już recenzowane. Strona merytoryczna i wartość naukowa uzyskanych wyników była wnikliwie oceniana przez Recenzentów i Edytora czasopism, którzy zaakceptowali prace do druku, co znacznie ułatwia zadanie Recenzentowi pracy doktorskiej. Przedstawione prace eksperymentalne stanowią logiczną całość, cele prac są jasno sprecyzowane, metody i wyniki są opisane szczegółowo, dyskusja jest przeprowadzona w sposób prawidłowy. Wartość poznawcza prac jest bardzo wysoka, o czym świadczy fakt ich opublikowania w renomowanych czasopismach naukowych.

W skład omawianej rozprawy doktorskiej, oprócz dwóch wymienionych publikacji naukowych, wchodzi 38 stronicowe opracowanie w formie manuskryptu zawierające streszczenie w języku polskim i angielskim, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp, rozdział opisujący hipotezę badawczą, cele i zakres badań, rozdział opisujący materiały i metody, rozdział opisujący otrzymane wyniki, rozdział opisujący ograniczenia badań, podsumowanie i wnioski oraz wykaz bibliografii w liczbie 57 pozycji, kopii publikacji oraz oświadczeń autorów publikacji. Opracowanie jest przygotowane w sposób staranny, chociaż w kilku miejscach Doktorantka stosuje skróty myślowe (np. chemeryna kontroluje (...) stany zapalne" (str. 4); „środowisko hormonalne"

(str. 5); „mechanizmów molekularnych rządzących implantacją” (str. 11); „badania *in vitro* na ludziach” (str. 12); „fiolka” (14); „każdą próbę (kontrola + chemeryna; n=4” (str. 19), czy zapożyczenia z języka angielskiego (np. „molekuł” (str. 11), „embrionów” (str. 11), „numer akcesyjny”). Przedstawione przykłady nie umniejszają jednak w żaden sposób wartości przedstawionej dysertacji i nie wpływają na jej ocenę. Bibliografia, do której odnosi się Doktorantka, jest wybrana w sposób adekwatny i odnosi się do najnowszych badań naukowych w przedstawionym zagadnieniu. Z obowiązku Recenzenta muszę jednak wspomnieć, iż w spisie literatury pozycja Liu 2008 jest niekompletna.

W dwustronicowym *Wstępie* opracowania polskojęzycznego Doktorantka przedstawiła w bardzo oszczędny sposób stan wiedzy w zakresie omawianego zagadnienia, co budzi mój niedosyt. Poszerzenie *Wstępu* o ogólne informacje dotyczące chemeryny i jej działania w procesach fizjologicznych, dokładne opisanie ekspresji receptorów chemeryny w macicy świni we wczesnej ciąży, przedstawienie w zwięzłej formie informacji o roli tkanki tłuszczowej w procesach rozrodczych podniosłoby wartość przygotowanego opracowania i podkreśliłoby dodatkowo, jak ważną rolę może odgrywać chemeryna w tym okresie. Ponadto stwierdzenie „(...) metabolizm i funkcje rozrodcze organizmu są ze sobą ściśle powiązane” wydaje mi się być skrótem myślowym, jeśli wziąć pod uwagę, że metabolizm jest to szereg reakcji biochemicznych oraz towarzyszących im przemian energetycznych zachodzących w komórce.

Cele pracy oraz hipoteza pracy zostały jasno i poprawnie sformułowane. Hipoteza badawcza została zweryfikowana poprzez 2 zadania badawcze.

Rozdział *Materiały i Metody* jest szczegółowy i obszerny. Został podzielony na podrozdziały, co pozwala z łatwością śledzić poszczególne etapy pracy eksperymentalnej oraz analizy danych. Skrawki błony śluzowej macicy pobrane od loszek będących w 15-16 dniu ciąży hodowano w warunkach *in vitro* z dodatkiem chemeryny w stężeniu 400 ng/ml. Następnie w zebranych materiale oznaczono wpływ chemeryny na: (1) globalną ekspresję genów przy użyciu metody sekwencjonowania następnej generacji, (2) globalną ekspresję białek przy użyciu LC-MS/MS. Doktorantka opisuje poszczególne etapy zarówno pracy laboratoryjnej, jak i analizy bioinformatycznej uzyskanych wyników. Podczas badań wykorzystwała takie metody jak wspomniane hodowle tkankowe, NGS, LC-MS/MS, qPCR oraz Western-blot, ale także, nieopisaną w *Materiałach i Metodach* analizę aktywności dehydrogenazy mleczanowej. Sposób zaplanowania, wykonania oraz opisanie

przeprowadzonych doświadczeń świadczy o dużym zrozumieniu i dobrym przygotowaniu Doktorantki do wykonywania prac eksperymentalnych.

Mimo starannie przygotowanego opisu rozdziału *Materiały i Metody*, po jego lekturze nasunęły mi się pewne spostrzeżenia i pytania. W polskojęzycznym opracowaniu, w przeciwieństwie do przedłożonych publikacji zabrakło informacji o zgodach Lokalnej Komisji Etycznej, informacji o medium hodowlanym i jego suplementach, wielkości/masie skrawków macicy użytych w hodowlach tkankowych, rodzaju odczynników użytych do pomiaru aktywności dehydrogenazy mleczanowej oraz wynikach tych pomiarów. Dodatkowo chciałabym, aby Doktorantka uzupełniła następujące informacje:

1. gdzie wykonano sekwencjonowanie następnej generacji? Informacja taka widnieje w przypadku opisu analizy proteomicznej.
2. jaka była minimalna liczba odczytów w sekwencjonowaniu następnej generacji?
3. jakie były kryteria wyboru krotności zmian poziomu ekspresji genów uzyskanych w wyniku sekwencjonowania następnej generacji?
4. czy podane ilości składników mieszaniny reakcyjnej do reakcji qPCR na stronie 17 są prawidłowe?
5. dlaczego przyjęto odcięcie krotności na stosunkowo niskim poziomie ± 1.2 podczas analizy danych pochodzących z LC-MS/MS?
6. przyjmuje się, że TGF- β 1 jako monomer posiada masę molekularną 12,5 kDA, cytokina ta występuje zazwyczaj jako dimer o masie molekularnej 25 kDA, zatem czy zamierzone było w analizie Western blot użycie przeciwciał skierowanych przeciwko TGF- β 1 o masie cząsteczkowej 44 kDA, co odpowiada nieaktywnemu kompleksowi TGF β 1-LAP?

W rozdziale *Wyniki* Pani mgr Kinga Aleksandra Orzechowska z dużą dbałością opisała wyniki zawarte w pracach stanowiących rozprawę doktorską. Rozdział ten został podzielony na podrozdziały, z których każdy dotyczy osobnej pracy badawczej. Przedstawione wyniki zawierają bezpośrednie odnośniki do Tabel oraz Rycin zawartych w publikacji 1 oraz 2. Rozdział ten przygotowany jest w sposób rzetelny i przejrzysty.

W rozdziale *Ograniczenia badań* Doktorantka opisała ograniczenia przeprowadzonych doświadczeń, co wskazuje na jej wysoką świadomość naukową dotyczącą prowadzonych badań.

W rozdziale *Podsumowanie i wnioski* Pani mgr Kinga Aleksandra Orzechowska wysnuła dwa wnioski. Niemniej jednak w mojej opinii Doktorantka nie wykorzystała

potencjału tkwiącego w uzyskanych wynikach podczas ich interpretacji oraz formułowania wniosków. W moim odczuciu rozdział ten powinien być bardziej rozbudowany. Ponadto uważam, iż bez badań funkcjonalnych otrzymane wyniki jedynie sugerują udział chemeryny w migracji i adhezji komórek etc., a nie jak widnieje we wniosku pierwszym, wskazują, że chemeryna bierze udział w kontroli, migracji i adhezji komórek. Co więcej, wniosek dotyczący roli chemeryny jako czynnika związanego z dysfunkcją komórek śródbłónka w patogenezie stanu przedrzucawkowego wydaje się nadinterpretacją.

Chciałabym również, aby Pani mgr Kinga Aleksandra Orzechowska odniosła się do następujących pytań:

1. cytując informację zawartą na stronie 12 „(...) wykazano, że chemeryna obecna jest (...) w macicy, trofoblastach i zarodkach świni (...)”, które komórki wg Autorki są głównym źródłem chemeryny w macicy, trofoblastach i zarodkach świni? Czy badana w 15-16 dniu ciąży chemeryna pochodzi z macicy, zarodka, czy tkanki tłuszczowej? Jakie doświadczenia zaproponowałaby Doktorantka, by wyjaśnić tę kwestię?
2. jakie czynniki pełniące ważną funkcję w okresie zagnieżdżenia zarodka w błonie śluzowej macicy świni wg Autorki mogą być wytwarzane w odpowiedzi na chemerynę? Pytanie to zadaję w kontekście przedstawionej hipotezy badawczej, która głosi, że „chemeryna (...) kontroluje wytwarzanie wielu czynników istotnych dla prawidłowego przebiegu implantacji.”
3. jakie znaczenie mają uzyskane wyniki pochodzące z analizy sekwencjonowania następnej generacji, a dotyczące ekspresji długich, niekodujących RNA?
4. jak należy interpretować uzyskane wyniki w kontekście powiązania stanu metabolicznego organizmu z funkcjami rozrodczymi?
5. jakie badania *in vitro* i *in vivo* zaproponowałaby Autorka, aby pogłębić stan wiedzy na temat chemeryny w świetle uzyskanych wyników?
6. proszę wskazać, w których etapach analizy bioinformatycznej wyników uzyskanych w ramach sekwencjonowania następnej generacji oraz LC-MS/MS Doktorantka brała udział.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr Kingi Aleksandry Orzechowskiej oceniam wysoko. Przedłożona rozprawa doktorska bez wątpienia prezentuje wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia

pracy naukowej. Otrzymane wyniki są oryginalne, wartościowe i w znaczny sposób poszerzają dotychczasową wiedzę na temat roli chemeryny w okresie zagnieżdżenia zarodka. Uzyskane wyniki otwierają nowe obszary badań dotyczące roli tej adipokiny w okresie wczesnej ciąży u świni. Ponadto wyniki badań sugerują, że chemeryna bezpośrednio wpływa na ważne procesy w okresie wczesnej ciąży w błonie śluzowej macicy świni, co w przyszłości może zostać wykorzystane do skutecznej kontroli tych procesów u zwierząt gospodarskich.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Aleksandry Orzechowskiej pt. „Wpływ chemeryny na profil transkryptomiczny i proteomiczny błony śluzowej macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie implantacji” spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2021, r. poz. 478 ze zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr Kingi Aleksandry Orzechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

dr hab. Anna Szóstek-Mioduchowska
dr hab. Anna Szóstek-Mioduchowska