

Kraków, 17-11-2021



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

dr hab. Małgorzata Duda, Prof. UJ  
Zakład Endokrynologii  
Katedra Fizjologii Zwierząt  
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych  
Wydział Biologii UJ

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr. Damiana Tańskiego pod tytułem:

**Profil ekspresji wybranych akwaporyn w jajowodzie i macicy świni domowej  
(*Sus scrofa domestica* L.)**

wykonanej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i  
Biotechnologii UWM w Olsztynie, pod opieką naukową Prof. dr. hab. Mariusza T.  
Skowrońskiego

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z tematycznie spójnego cyklu dwóch prac naukowych, opublikowanych w latach 2020-2021, które zostały opatrzone streszczeniem (w języku polskim i angielskim), wstępem, zwięzłym opisem celów badań, krótkim opisem stosowanych metod i uzyskanych wyników, a także podsumowaniem wraz z wnioskami. Układ ten jest zgodny z wytycznymi Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii UWM w Olsztynie. Obydwa artykuły, opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej, są pracami wieloautorskimi, których łączny współczynnik oddziaływania wynosi blisko dziewięć, natomiast suma punktów MEiN – 280 (wg punktacji za rok 2021). Do rozprawy zostały dołączone pisemne oświadczenia, w których wszyscy współautorzy szczegółowo określili swoje zaangażowanie w wykonanie badań i przygotowanie poszczególnych artykułów do druku. Z treści oświadczeń wynika jednoznacznie wiodący udział Doktoranta, polegający na: aktywnym uczestnictwie w opracowaniu koncepcji oraz metodyki badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych, interpretacji i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu publikacji do druku. W każdej z tych publikacji mgr Damian Tański zajmuje pozycję pierwszego autora, jest także autorem korespondencyjnym. Warto nadmienić, że część doświadczalną pracy doktorskiej zrealizowano w oparciu o środki finansowe pochodzące z dwóch projektów badawczych Narodowego Centrum Nauki (2013/09/B/NZ9/03129 i 2016/21/B/NZ9/03535).

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: 12 664 50 98

Składające się na rozprawę doktorską oryginalne prace badawcze były poddane wnikliwej analizie i ocenie przez redakcję czasopism i niezależnych recenzentów, a sam fakt opublikowania wskazuje na ich wysoką wartość naukową. Powyższe publikacje stanowią cenne uzupełnienie badań przeprowadzonych dotychczas przez zespół Prof. dr. hab. Mariusza T. Skowrońskiego oraz innych badaczy, a ich tematyka konsekwentnie dąży do weryfikacji hipotez badawczych zakładających, że: 1) ilość transkryptu badanych akwaporyn (*AQP1*, *AQP5* i *AQP9*) w jajowodzie świni zależy od fazy cyklu rujowego oraz etapów wczesnej ciąży; 2) hormony steroidowe: estradiol i progesteron oraz kwas arachidonowy biorą udział w regulacji ekspresji genów poszczególnych akwaporyn (*AQP1*, *AQP2*, *AQP5* i *AQP7*) w komórkach nabłonka powierzchniowego macicy świni w okresie okołouwulacyjnym, za pośrednictwem kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK) oraz kinazy białkowej A (PKA).

Eksperymenty opisane w prezentowanych publikacjach zatwierdzone zostały przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie.

**Artykuł 1.** Tański, D., Skowrońska, A., Eliszewski, M., Gromadzinski, L., Kempisty, B., & Skowroński, M. T. (2020). Changes in aquaporin 1, 5 and 9 gene expression in the porcine oviduct according to estrous cycle and early pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2777. <https://doi.org/10.3390/ijms21082777>

W pierwszej pracy składającej się na rozprawę doktorską, mgr Damian Tański podjął się oceny ekspresji *AQP1*, *AQP5* i *AQP9* w jajowodzie świni (tu: lejek, bańka i cieśń) podczas wybranych etapów cyklu rujowego i ciąży. Do analizy wybrano materiał izolowany od zwierząt będących odpowiednio w 2 do 4 dnia cyklu rujowego (tzw. faza wczesno-lutealna); w 10 do 12 dnia cyklu rujowego (tzw. faza środkowo-lutealna), kiedy ciało żółte jest w pełni funkcjonalne, a jego aktywność jest zbliżona do aktywności ciała żółtego ciążowego; w 14 do 16 dnia cyklu rujowego (tzw. faza późno-lutealna), kiedy ciało żółte podlega luteolizie oraz 18 do 20 dnia cyklu rujowego (tzw. faza pęcherzykowa), kiedy ma miejsce intensywny wzrost i dojrzewanie oocytu wewnątrz rozwijających się pęcherzyków jajnikowych. Ocenie poddano także jajowody pobrane od zwierząt ciężarnych, będących w 14 do 16 dnia ciąży, czyli w okresie przed implantacją zarodka oraz w 30 do 32 dnia ciąży, czyli w okresie poimplantacyjnym. Doktorant, zgodnie z metodyką stosowaną w macierzystym zespole, stosując technikę Real-Time PCR wykazał, że poziom ekspresji mRNA *AQP1*, *AQP5* i *AQP9* w jajowodzie świni jest ściśle zależny od fazy cyklu rujowego oraz etapu ciąży. Otrzymane wyniki sugerują, że właściwy poziom ekspresji genów badanych akwaporyn w jajowodzie świni jest kluczowy dla utrzymania odpowiedniego mikrośrodowiska warunkującego prawidłowy przebieg zapłodnienia oraz późniejszy rozwój embrionalny. Wyniki otrzymane dzięki realizacji celów badawczych publikacji Tański i wsp. (2020) umożliwiły weryfikację pierwszej hipotezy badawczej recenzowanej rozprawy doktorskiej.

**Artykuł 2:** Tański, D., Skowrońska, A., Tańska, M., Lepiarczyk, E., & Skowroński, M. T. (2021). The in vitro effect of steroid hormones, arachidonic acid, and kinases inhibitors on aquaporin 1, 2, 5, and 7 gene expression in the porcine uterine luminal epithelial cells during the estrous cycle. *Cells*, 10(4), 832. <https://doi.org/10.3390/cells10040832>

Mając na uwadze, wykazaną wcześniej przez zespół prof. Skowrońskiego, specyficzną zmienność ekspresji AQP1, 5 i 9 w układzie rozrodczym świni w czasie cyklu rujowego i ciąży oraz ich sugerowaną, kluczową rolę w utrzymaniu odpowiednio nawodnionego mikrośrodowiska w macicy, celem kolejnej pracy wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej mgr. Tańskiego była analiza wpływu wybranych czynników: hormonów steroidowych – estradiolu i progesteronu oraz substratu do syntezy wytwarzanych w macicy prostaglandyn - kwasu arachidonowego, w regulacji ekspresji *AQP1*, *AQP2*, *AQP5* i *AQP7* w hodowanych *in vitro* komórkach nabłonka powierzchniowego macicy świni. Komórki nabłonka powierzchniowego macicy izolowano od zwierząt będących w okresie okołoolulacyjnym (tj. 18 - 20 dzień cyklu rujowego) oraz w fazie wczesno-lutealnej (tj. dzień 2 - 4 cyklu rujowego). Dodatkowo, celem zbadania udziału szlaków sygnałowych PKA i MAPK w ekspresji genów wybranych akwaporyn zastosowano specyficzne inhibitory w/w szlaków, odpowiednio: H68 i PD98059, które dodawano do pożywki hodowanych komórek nabłonkowych. Doktorant, zgodnie z metodyką stosowaną w macierzystym zespole, stosując technikę Real-Time PCR potwierdził ekspresję *AQP1* i *AQP5* w komórkach nabłonka powierzchniowego macicy świni. Dodatkowo, po raz pierwszy wykazał ekspresję *AQP2* i *AQP7* w tych komórkach. Otrzymane wyniki dowodzą także ważnej roli zastosowanych hormonów steroidowych oraz kwasu arachidonowego w regulacji ekspresji *AQP1*, *AQP2*, *AQP5* i *AQP7* w macicy świni podczas cyklu rujowego, szczególnie w okresie okołoolulacyjnym. Co więcej, uzyskane przez Doktoranta wyniki dostarczyły dowodów, że zastosowane hormony steroidowe oraz kwas arachidonowy regulują ekspresję *AQP1* i *AQP5* za pośrednictwem PKA i MAPK. Wyniki otrzymane dzięki realizacji celów badawczych publikacji Tański i wsp. (2021) weryfikują drugą hipotezę badawczą recenzowanej rozprawy doktorskiej.

W trakcie lektury publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr. Damiana Tańskiego nie znalazłam elementów problematycznych, czy wzbudzających wątpliwości. Z pewnością dlatego, że obydwie prace zostały poddane rzeczowej i wnikliwej ocenie przez kompetentnych recenzentów wydawniczych. Moja rola zatem sprowadza się do oceny manuskryptu polskojęzycznego będącego autorskim opracowaniem Doktoranta, ujawniającym Jego zasób wiedzy, umiejętność formułowania wniosków i posługiwania się piśmiennictwem naukowym.

Oryginalne prace badawcze, które składają się na rozprawę, opatrzone zostały niezwykle oszczędnym, 25-stronicowym omówieniem zawierającym: streszczenie w języku polskim i angielskim, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp będący

syntetycznym przeglądem literatury, cele pracy, hipotezy i zadania badawcze, materiały i metody, wyniki, podsumowanie i wnioski oraz wykaz wybranych pozycji bibliografii (30).

W krótkim, 3-stronicowym Wstępie Doktorant przedstawił zagadnienia będące podstawą rozprawy doktorskiej. Kolejno omówił budowę układu rozrodczego samicy ze szczególnym uwzględnieniem jajowodów oraz macicy. W sposób niezwykle syntetyczny scharakteryzował akwaporyny i przedstawił aktualne informacje odnośnie występowania i roli poszczególnych izoform w układzie rozrodczym ssaków. Szkoda, że nie pojawiło się wyjaśnienie na jakiej podstawie dokonano wyboru związków biologicznie aktywnych (tu: estradiol, progesteron, kwas arachidonowy) mogących potencjalnie uczestniczyć w regulacji ekspresji genów badanych akwaporyn.

W kolejnym rozdziale: Cel pracy, hipotezy i zadania badawcze, Doktorant w przekonujący sposób wyjaśnił potrzebę prowadzenia badań w proponowanym obszarze, przedstawił hipotezy badawcze, cele pracy oraz sformułował zadania badawcze (2). To czego w mojej opinii zabrakło to wyjaśnienia dlaczego jako model badawczy zastosowano świnię. Odpowiedź na to pytanie można co prawda znaleźć w dołączonych publikacjach, ale uważam, że informacja ta jest istotna i powinna znaleźć się również w opisie celów pracy dołączonego opracowania.

Opis metodyki prowadzonych badań zajmuje 5 stron, na których Doktorant opisuje model doświadczalny, krótko charakteryzuje procedury wstępnego przygotowania materiału eksperymentalnego do badań oraz przedstawia metody badawcze stosowane w ocenianej pracy: hodowlę in vitro komórek nabłonka powierzchniowego macicy świni oraz łańcuchową reakcję polimerazy z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR). W opisie materiałów i metod stosowanych w trakcie prac badawczych realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej zabrakło nie tylko charakterystyki stosowanych inhibitorów szlaków sygnałowych ale także rozwinięcia ich skróconej nazwy. Brakuje także informacji o ich pochodzeniu (firma i kraj pochodzenia). Ta uwaga dotyczy także wykorzystanych hormonów i kwasu arachidonowego. W podrozdziale 3.3 (strona 13) pojawia się sformułowanie dotyczące stosowania FBS: „...oczyszczonej 10% dekstranem/węglem aktywnym...”. Należałoby wyjaśnić precyzyjnie powód przeprowadzonej procedury. Kilka linijek poniżej pojawia się co prawda sformułowanie odnośnie dodawania do pożywki hodowlanej: „...1% FBS wolnego od steroidów i antybiotyków...” co w dalszym stopniu jest niewystarczające.

W rozdziale Wyniki opisano w skondensowanej formie wyniki zawarte w dwóch pracach stanowiących rozprawę doktorską. Rozdział ten podzielono na podrozdziały, z których każdy dotyczył osobnej pracy badawczej składającej się na rozprawę.

Polskojęzyczne opracowanie zamyka niezwykle lapidarne Podsumowanie oraz 5 Wniosków końcowych, które potwierdzają, że postawione cele pracy zostały zrealizowane i stanowią istotny wkład w poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat nie tylko ekspresji genów wybranych akwaporyn, ale także wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów

związanych z regulacją ich ekspresji w układzie rozrodczym świni podczas cyklu rujowego i wczesnych etapów ciąży. Na koniec mogę tylko wyrazić żal, że Doktorant nie pokusił się o napisanie Diskusji do opracowania polskojęzycznego rozprawy doktorskiej. W mojej ocenie kompleksowa Dyskusja podsumowująca wszystkie otrzymane wyniki, potwierdziłaby w sposób jednoznaczny ich spójność, a także dowiodłaby umiejętności analitycznych Doktoranta.

Moje nieliczne uwagi mogłyby dotyczyć jedynie licznych błędów językowych i redakcyjnych polskojęzycznego opracowania, co w żaden sposób nie umniejszyłoby merytorycznej wartości pracy. Z obowiązku recenzenta, chciałabym jednak, żeby Doktorant odniósł się do zdania zamieszczonego w Streszczeniu (strona 4) odnośnie ekspresji akwaporyn w jajowodzie świni i oraz komórkach nabłonka powierzchniowego macicy – co rozumie przez stwierdzenie, że owa ekspresja „może stanowić fizjologiczną pożywkę, która podtrzymuje i wzmaga zapłodnienie oraz rozwój embrionalny na wczesnym etapie ciąży”? Proszę także o logiczne wyjaśnienie zastosowanego przez Doktoranta sposobu cytowania literatury.

#### PODSUMOWANIE I WNIOSEK KOŃCOWY

Po przeczytaniu rozprawy doktorskiej mgr. Damiana Tańskiego nie mam wątpliwości, że uzyskane przez niego interesujące i kompleksowe wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę na temat mechanizmów pełniących istotną rolę w zachowaniu odpowiedniej homeostazy wodnej w układzie rozrodczym świni. W mojej ocenie przedstawiona do recenzji rozprawa jest dowodem dojrzałości naukowej Autora oraz jego dobrego przygotowania merytorycznego i warsztatowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy 1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595; z późniejszymi zmianami) stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pana mgr. Damiana Tańskiego oraz dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

