



Dr hab. Magdalena Kowalik

Olsztyn, 18.11.2021

Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności

Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Damiana Tańskiego**  
**pt. "Profil ekspresji wybranych akwaporyn w jajowodzie i macicy**  
**świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)"**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Damiana Tańskiego pt. "*Profil ekspresji wybranych akwaporyn w jajowodzie i macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)*" wykonana została pod opieką Promotora naukowego Pana prof. dr hab. Mariusza Skowrońskiego w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Badania do pracy doktorskiej realizowano w oparciu o środki finansowe pochodzące z Narodowego Centrum Nauki, projekty OPUS nr 2013/09/B/NZ9/03129 oraz OPUS nr 2016/21/B/NZ9/03535.

Podstawą ocenianej dysertacji są dwie spójne tematycznie, oryginalne publikacje naukowe oraz poprzedzające je zwięzłe opracowanie w formie manuskryptu, przygotowane w języku polskim. Przedstawione do oceny publikacje ukazały się w latach 2020 i 2021 w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR). Prace stanowiące rozprawę doktorską:

1. **Tanski D**, Skowronska A, Eliszewski M, Gromadzinski L, Kempisty B, Skowronski MT. Changes in *Aquaporin 1, 5 and 9* Gene Expression in the Porcine Oviduct According to Estrous Cycle and Early Pregnancy. *International Journal of Molecular Science* 2020, 21(8): 2777. (IF<sub>2020</sub> = 4,556, MEiN = 140 pkt.)
2. **Tanski D**, Skowronska A, Tanska M, Lepiarczyk E, Skowronski MT. 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* 2021, 10(4): 832. (IF<sub>2021</sub> = 4,366, MEiN = 140 pkt.)

Łączny współczynnik oddziaływania (IF) czasopism, w których opublikowano prace stanowiące rozprawę doktorską wynosi **8,922**, natomiast suma punktów MEiN (z dnia 09.02.2021r.) to **280**.

Należy podkreślić, że w obu publikacjach Pan mgr Damian Tański jest pierwszym autorem, a także autorem korespondencyjnym. Zgodnie z dołączonymi do rozprawy doktorskiej oświadczeniami wszystkich współautorów publikacji, udział Doktoranta w każdej z prac był wiodący i polegał na opracowaniu koncepcji oraz metodyki badań, pobieraniu materiału doświadczalnego, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu



wyników oraz przygotowaniu publikacji do druku. W związku z tym znaczący wkład Doktoranta w powstanie każdej z prac nie budzi żadnych wątpliwości.

Przedłożone do oceny publikacje są spójne tematycznie i skupiają się wokół wyraźnie wyodrębnionego zagadnienia, dotyczącego scharakteryzowania profilu ekspresji wybranych akwaporyn (AQP) oraz zidentyfikowania czynników regulujących ich ekspresję w tkankach układu rozrodczego świni domowej w czasie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży. Podjęta przez Doktoranta tematyka badawcza jest w pełni uzasadniona i jest kontynuacją naukowych zainteresowań Promotora oraz Zespołu badawczego, w którym Doktorant realizował badania.

Utrzymanie równowagi wodnej i tym samym zachowanie właściwej homeostazy komórek jest niezbędnym czynnikiem warunkującym prawidłowe funkcjonowanie organizmów żywych. Kluczowym elementem tego procesu jest transport wody przez błony komórkowe, w którym uczestniczą wyspecjalizowane białka błonowe tworzące kanały wodne, zwane akwaporynami (AQP). To właśnie akwaporyny są przedmiotem badań w niniejszej pracy doktorskiej. Akwaporyny należą do dużej rodziny integralnych, hydrofobowych białek, które pozwalają na transport wody oraz innych związków, takich jak glicerol, mocznik, amoniak oraz cząsteczki gazów, przez błony biologiczne. Ich odkrycie wyróżniono w 2003 roku Nagrodą Nobla z dziedziny chemii i od tego czasu AQP budzą duże zainteresowanie i są tematem licznych badań naukowych. Dotychczas wykazano istotną rolę kanałów wodnych w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych, m. in. w regulacji ciśnienia krwi, sekrecji płynów, metabolizmie tłuszczu, a także angiogenezie guzów nowotworowych. Od kilku lat prowadzone są również badania nad ich rolą w regulacji funkcji rozrodczej. Dotychczas wykazano, że w układzie rozrodczym samicy, prawidłowe działanie akwaporyn jest kluczowe dla utrzymania funkcji rozrodczych, w tym przebiegu cyklu rujowego, procesu owulacji, implantacji oraz rozwoju zarodka. Wykazano, że AQP regulują m.in.: proces proliferacji, migracji, angiogenezy oraz adhezji, co wskazuje, że są one niezbędne w procesie odbudowy i regeneracji endometrium w czasie cyklu i ciąży. Dysfunkcja w strukturze lub działaniu kanałów wodnych prowadzi do zakłócenia homeostazy wodnej komórek/ tkanek rozrodczych i w konsekwencji może zaburzać płodność. Jednak molekularny mechanizm tego procesu oraz regulacja ekspresji AQP w układzie rozrodczym nie są w pełni wyjaśnione. Dostępne dane literaturowe wskazują na możliwy udział w tym procesie hormonów steroidowych oraz modulujące działanie wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych, w których pośredniczą cykliczny adenozylo-3'5'-monofosforan (cAMP), kinaza białkowa A (PKA) oraz kinazy aktywowane mitogenami (MAPK). Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Damiana Tańskiego wpisuje się w przedstawione zagadnienia. Ma ona na celu pełniejsze poznanie działania akwaporyn oraz identyfikację czynników regulujących ich ekspresję w tkankach układu rozrodczego samicy w czasie cyklu i ciąży, co może mieć znaczenie nie tylko poznawcze, ale również praktyczne. Zagadnienia poruszane przez Doktoranta są zatem aktualne i godne uwagi.



W pierwszej publikacji stanowiąca rozprawę doktorską, opublikowaną w *International Journal of Molecular Science*, Doktorant scharakteryzował profil ekspresji genów AQP1, AQP5 i AQP9 w poszczególnych odcinkach jajowodu świni (lejku, bańce i cieśni) podczas czterech faz cyklu rujowego: wczesnolutealnej (dzień 2-4), środkowo-lutealnej (dzień 10-12), lutealnej (dzień 14-16) i pęcherzykowej (dzień 18-20 cyklu), oraz w dwóch okresach ciąży: okres implantacyjny (dzień 14-16 ciąży) oraz okres poimplantacyjny (dzień 30-32 ciąży). Doktorant wykazał specyficzny wzór ekspresji badanych akwaporyn zależny od fazy cyklu oraz okresu ciąży, co sugeruje możliwy udział hormonów steroidowych w regulacji ekspresji AQP w badanej tkance. Ponadto, uzyskane dane wskazują na udział AQP1, AQP5 i AQP9 w regulacji funkcji jajowodu w czasie cyklu oraz ciąży. Należy zaznaczyć, że jajowód tworząc odpowiednie warunki pozwalające na transport gamet, ich dojrzewanie oraz zapewniając optymalne warunki do zapłodnienia odgrywa istotną rolę w zapłodnieniu i wczesnym rozwoju zarodkowym, dlatego też poznanie roli AQP w tym narządzie ma istotne znaczenie.

W pracy opublikowanej w czasopiśmie *Cells*, Doktorant: (1) określił ekspresję genów AQP1, AQP2, AQP5 i AQP7; (2) zbadał wpływ hormonów steroidowych: estradiolu (E2) i progesteronu (P4) oraz kwasu arachidonowego (AA) na poziom ekspresji badanych AQP; oraz (3) zidentyfikował możliwe ścieżki sygnalizacyjne zaangażowane w regulację ich ekspresji w komórkach nabłonka błony śluzowej macicy. Doświadczenia wykonano na modelu *in vitro* komórek nabłonka powierzchniowego błony śluzowej macicy wyizolowanych od svin będących w fazie pęcherzykowej oraz fazie wczesno-lutealnej cyklu. Doktorant wykazał po raz pierwszy ekspresję genów AQ2 i AQ7 oraz potwierdził ekspresję genów AQP1 i AQP 5 w komórkach nabłonka powierzchniowego endometrium świni. Ponadto, Pan mgr Damian Tański wykazał, że ekspresja badanych izoform AQP jest regulowana przez hormony steroidowe i kwas arachidonowy, oraz zależy od aktywacji/ hamowania szlaków sygnałowych związanych z kinazami PKA i MAPK w komórkach nabłonka endometrium w okresie okołoolulacyjnym. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że P4, E2, AA oraz inhibitory PKA i MAPK są modulatorami ekspresji AQP w macicy i mogą regulować funkcje endometrium, a tym samym kontrolować prawidłowy przebieg cyklu i ciąży u świni. Uzyskane dane poszerzają wiedzę o możliwych czynnikach regulujących ekspresję i działanie akwaporyn w utrzymaniu homeostazy wody w endometrium macicy świni.

Lektura powyższych publikacji, które były już uprzednio recenzowane, była dla mnie satysfakcjonująca i nie mam właściwie żadnych uwag merytorycznych. Publikacje opublikowane w recenzowanych czasopismach z listy JCR ułatwiają zadanie recenzentowi. Zarówno strona merytoryczna, jak i wartość naukowa uzyskanych wyników została poddana wnikliwej ocenie oraz potwierdzona przez Recenzentów i Edytorów czasopism, którzy zaakceptowali prace do druku. Prace stanowią logiczny układ, są napisane zrozumiale z jasno postawionymi celami, szczegółowym opisem metod oraz wyników, a także prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. Dane przedstawione w obu publikacjach mają charakter nowatorski.



Wartość poznawczą wyników otrzymanych przez Pana mgr Damiana Tańskiego oceniam wysoko, o czym świadczy fakt opublikowania dwóch publikacji w renomowanych czasopismach o tematyce obejmującej fizjologię i biologię rozrodu.

Jak wspomniałam integralną częścią rozprawy, oprócz kopii publikacji, jest zwięzłe, 25 stronicowe opracowanie w formie manuskryptu, zawierające: spis publikacji składających się na rozprawę doktorską; streszczenie w języku polskim i angielskim; wstęp będący syntetycznym przeglądem literatury; cel pracy, hipotezy i zadania badawcze; materiał i metody; wyniki; podsumowanie i wnioski oraz wykaz wybranych pozycji bibliografii w liczbie 30. Opracowanie to jest przygotowane w sposób klarowny, chociaż zdarzają się w tej części błędy stylistyczne, edytorskie, skróty myślowe, czy zapożyczenia z języka angielskiego, wynikające z bezpośredniego tłumaczenia tekstu publikacji (np. „ekspresja akwaporyn może stanowić fizjologiczną pożywkę” (str. 4), „rozwój embrionalny na wczesnym etapie cięcia” (str. 4), „struktura rozrodczego samicy” (str. 8), „transdukcja” zamiast przekazywanie (str. 9) itp.), na które jako recenzentka mam obowiązek zwrócić uwagę. Nie wpływają one jednak na wspomnianą wysoką ocenę dysertacji.

W krótkim *Wstępie* Doktorant przedstawił w zwięzły sposób dotychczasowy stan wiedzy w zakresie omawianego zagadnienia. Rozdział ten jest napisany poprawnie i prowadzi do postawionych hipotez badawczych oraz celu pracy, co świadczy o dobrym zrozumieniu tematu przez Doktoranta. Cele pracy oraz hipotezy badawcze zostały jasno i poprawnie sformułowane. Wyróżnione zostały dwa zadania badawcze, które następnie były konsekwentnie realizowane. Opis metodyki prowadzonych badań jest dokładny i rzetelny. Należy zaznaczyć, że badania prowadzono w warunkach *in vivo* na odcinkach jajowodu oraz *in vitro* na komórkach nabłonka błony śluzowej macicy. Podczas badań Doktorant wykorzystał metody analityczne takie jak izolacja RNA, analiza poziomu ekspresji genów metodą Real-Time PCR, inkubacja *in vitro* komórek nabłonka błony śluzowej, co umożliwiło realizację założonych celów i uzyskanie ciekawych, nowatorskich wyników. Całość zaplanowanych i wykonanych analiz świadczy o kompetencji metodologicznej Doktoranta oraz Jego przygotowaniu do planowania i wykonywania następnych prac eksperymentalnych. W rozdziale *Wyniki* Doktorant opisał w skondensowanej formie wyniki zawarte w pracach stanowiących rozprawę doktorską. Rozdział ten podzielony został na podrozdziały, z których każdy dotyczył osobnej pracy badawczej. Dodatkowo w rozdziale tym zamieszczono pięć tabel zawierających sumaryczne zestawienie uzyskanych wyników, co znacznie ułatwia analizę danych. Polskojęzyczne opracowanie zamyka rozdział *Podsumowanie i wnioski*, w którym sformułowano pięć wniosków, potwierdzających realizację założonych celów pracy i stanowiących istotny wkład w dotychczasową wiedzę na temat akwaporyn w tkankach układu rozrodczego samicy świni. Wnioski są poprawne i wynikają z otrzymanych rezultatów, jednak w mojej opinii wnioski 4 i 5 są tożsame i powinny zostać przereformułowane. Odczuwam również pewien niedosyt, gdyż zabrakło mi przejrzystego podsumowania uzyskanych wyników, co z resztą zostało poprawnie przedstawione w obu publikacjach wchodzących w skład dysertacji.



Po przeczytaniu pracy nasunęły mi się następujące spostrzeżenia i pytania, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, a wynikają jedynie z ciekawości oraz obowiązku recenzenta:

1. W rozdziale *Wstęp* zabrakło wg mnie klarownego wyjaśnienia dlaczego w jajowodach oraz komórkach nabłonka błony śluzowej macicy analizowano odmienne izoformy akwaporyn. Proszę uzasadnić czym kierowano się przy wyborze poszczególnych izoform AQP do badań?
2. Proszę wyjaśnić dlaczego w doświadczeniach *in vitro* zastosowano 24 – godzinną inkubację komórek nabłonka endometrium macicy z badanymi czynnikami. Czy brano pod uwagę inne czasy inkubacji?
3. Zarówno w opracowaniu, jak i w publikacjach, nie znalazłam informacji dotyczących czystości i żywotności wyizolowanych komórek nabłonka powierzchniowego macicy. Proszę o uzupełnienie tych informacji podczas publicznej obrony. Kierowana ciekawością zapytam również o ilość komórek nabłonka uzyskiwanych podczas izolacji z zastosowaniem dyspazy?
4. Czy nie sądzi Pan, że dysponując pobranymi już fragmentami poszczególnych odcinków jajowodu warto byłoby rozszerzyć analizy o pomiar ekspresji białek? Czy planowane są takie analizy?
5. W ostatnim wniosku umieszczono stwierdzenie, że „...produkcja kanałów wodnych jest modulowana przez wiele różnych szlaków transdukcji sygnałów w okresie okołoolulacyjnym”. Czy mógłby Pan szerzej omówić tą kwestię?

Za najważniejsze osiągnięcie rozprawy doktorskiej Pana mgr Damiana Tańskiego uznaję: (1) określenie profilu ekspresji genów AQP1, AQP5 i AQP9 w poszczególnych odcinkach jajowodu świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży; (2) wykazanie obecności transkryptów AQP1, AQP2, AQP5 i AQP7 w komórkach nabłonka powierzchniowego błony śluzowej macicy świni w warunkach *in vitro*; (3) wykazanie wpływu hormonów steroidowych oraz kwasu arachidonowego na ekspresję badanych akwaporyn w komórkach nabłonka błony śluzowej macicy w okresie okołoolulacyjnym; oraz (4) zidentyfikowanie szlaków sygnalizacji komórkowej zaangażowanych w regulację ekspresji akwaporyn w macicy świni.

**Podsumowując**, rozprawę doktorską Pana mgr Damiana Tańskiego oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona oryginalne opracowanie naukowe, wykazuje ogólną wiedzę Doktoranta oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Otrzymane przez Doktoranta wyniki są wartościowe i poszerzają dotychczasową wiedzę na temat roli akwaporyn w układzie rozrodczym świni domowej. Uzyskane wyniki badań stanowią nie tylko wartość poznawczą, ale są również podstawą do planowania i prowadzenia dalszych interesujących eksperymentów.



## WNIOSEK KOŃCOWY

Z pełnym przekonaniem uznaję, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Damiana Tańskiego: *"Profil ekspresji wybranych akwaporyn w jajowodzie i macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)"* spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. 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 zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Damiana Tańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoki poziom naukowy uzyskanych wyników badań, które opublikowano w dwóch publikacjach, w bardzo dobrych, renomowanych czasopismach z wysokim IF, wnioskuję o wyróżnienie dysertacji.

Z poważaniem,

dr hab. Magdalena Kowalik