

dr hab. Alina Gajewska, prof. nadzwyczajny

Zakład Fizjologii

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN

ul. Instytucka 3

05-110 Jabłonna k/Warszawy

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Magdaleny Młotkowskiej „Ekspresja wybranych akwaporyn w komórkach pęcherzyka jajnikowego świni” (*Sus scrofa f.domestica*) wykonanej w Katedrze Fizjologii Zwierząt na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem promotora Pana dr hab. n. wet. Mariusza Skowrońskiego i promotora pomocniczego Pani dr Agnieszki Skowrońskiej.

OCENA OGÓLNA ROZPRAWY

Odkrycie w błonie komórkowej złożonego układu specyficznych białek odpowiedzialnych za trans-membranową regulację transportu wody, dało impuls do rozwoju badań poświęconych fundamentalnemu mechanizmowi rządzącemu procesem podtrzymującym życie komórek. Promotor rozprawy, Pan dr hab. Mariusz Skowroński jest uznanym, o międzynarodowej renomie, specjalistą w zakresie badań akwaporyn i pionierem we wprowadzeniu związanej z nimi problematyki badawczej w Polsce. Jego wcześniejsze prace dotyczące ekspresji akwaporyn w jajniku stanowiły przesłankę do podjętych przez Doktorantkę własnych prac eksperymentalnych. Ich celem było poszukiwanie zależności między zmieniającymi się hormonalnie wybranymi fazami cyklu (2-4, 10-12, 14-16 i 18-20 dzień) i fazami wczesnej ciąży (14-16 i 18-20 dzień) a dynamiką ekspresji genów i białek trzech wybranych akwaporyn: AQP1, AQP5 i AQP9 w pęcherzyku jajnikowym świni. Następnie, po analizie wyników otrzymanych w badaniach *in vivo*, Doktorantka skupiła się na zakładanym regulacyjnym oddziaływaniu hormonu luteinizującego (LH), folikulotropowego, (FSH), hormonu wzrostu (GH) i prolaktyny (PRL) na profil ekspresji genów i białek AQP1, AQP5 i AQP9 w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej, izolowanych z pęcherzyków średnich i dużych. Badania te przyniosły nowatorskie i wartościowe poznawczo wyniki. Dla każdej z badanych akwaporyn, Doktorantka wykazała genowo/białkowo specyficzne zmiany w profilu ich ekspresji w wybranych fazach cyklu i wczesnej ciąży. Otrzymane dane potwierdziły zakładany udział hormonów przedniego

płata przysadki w specyficznej regulacji aktywności wybranych akwaporyn w wyspecjalizowanych komórkach pęcherzyka jajnikowego. Ekspresja białka AQP1 podlegała specyficznym komórkowo oddziaływaniu FSH, LH i GH, podczas, gdy na ekspresję mRNA i białka AQP5 w pęcherzykach ziarnistych wpływał tylko prolaktyna. Ten aspekt badań zasługuje na szczególne podkreślenie nie tylko ze względu na jego wagę odnośnie aktywności akwaporyn, lecz także ze względu na wskazanie kolejnego obszaru regulacyjnego, w którym zaangażowane są hormony przedniego płata przysadki w jajniku. Warto podkreślić, że praca przyniosła interesujące obserwacje, wskazujące na kluczowe znaczenie interakcji komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej w transdukcji specyficznego, indukowanego przez hormony przysadkowe sygnału transkrypcyjnego do poszczególnych genów akwaporyn w tych komórkach. Rezultaty badań dowodzą też udziału białek AQP1 i AQP5 w transporcie wodnym przez błony komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej.

Część z zaprezentowanych w rozprawie wyników została opublikowana w 2015 roku, w umieszczonym na liście JCR, czasopiśmie *Physiological Research*.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma formę liczącej 93 strony monografii przygotowanej zgodnie z kanonem dla tego typu prac, na który składają się rozdziały: Streszczenie (w językach polskim i angielskim), Wstęp, Cele pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Bibliografia. Integralną częścią tekstu są 24 rysunki oraz 4 tabele.

OCENA SZCZEGÓŁOWA ROZPRAWY

Wstęp

Rozdział składa się z 11 stron tekstu wraz z trzema rysunkami. Rozpoczyna się zwięzłą charakterystyką znaczenia wody jako kluczowego medium warunkującego funkcjonowanie komórek, narządów i w konsekwencji organizmu. Następnie, Doktorantka omawia złożony mechanizm regulujący transbłonowy transport wody. Skupia się na akwaporynach, wyspecjalizowanych integralnych białkach błonowych tworzących kanały wodne, odkrycie których wyróżniono w 2003 roku Nagrodą Nobla z dziedziny chemii. Wnikliwie, z uwzględnieniem specyficznych izoform akwaporyn, omawia ich strukturalną i funkcjonalną charakterystykę, a następnie syntetycznie przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący udziału tych białek w regulacji funkcjonowania żeńskiego układu rozrodczego. Mając na względzie obiekt swych badań, czyli pęcherzyk jajnikowy świni domowej, osobną, odnoszącą się do najnowszych publikacji część tekstu, Doktorantka poświęca potencjalnej roli, jaką w regulacji aktywności pęcherzyka mogą pełnić akwaporyny. Wstęp kończy klarowny, trzypięciowy opis mechanizmów regulujących rozwój pęcherzyka jajnikowego z uwzględnieniem mniej dotychczas poznanego aspektu rozwoju pęcherzyków w okresie wczesnej ciąży. Doktorantka

wskazuje na brak w dotychczasowym piśmiennictwie specjalistycznym prac dotyczących roli akwaporyn w regulacji aktywności pęcherzyków u samic ciężarnych. Cały rozdział stanowi logiczną, przemyślaną koncepcję narracyjną i dobrze uzasadnia celowość podjętych badań.

Do tej części tekstu nie mam uwag.

Cel

W tym fragmencie tekstu sformułowano hipotezę badawczą: „Hormony, które wpływają na proces steroidogenezy w pęcherzykach jajnikowych tj. FSH, LH, PRL i GH, uczestniczą także w regulacji ekspresji mRNA i białka AQP1, 5, 9 i mają wpływ na ich działanie. Ponadto zakładano, że zastosowane w badaniach hormony mogą wpływać na dystrybucję akwaporyn w komórkach pęcherzyka jajnikowego.” Do weryfikacji hipotezy Doktorantka przedstawiła siedem szczegółowych celów w badawczych.

Pytania i uwagi

1. Zaprezentowana hipoteza badawcza odnosi się tylko do spodziewanych regulacyjnych oddziaływań hormonów przedniego płata przysadki na układ akwaporyn w pęcherzykach jajnikowych. Doktorantka nie uwzględniła jednak, testowanych następnie, założeń o spodziewanej dynamice zmian ekspresji genów i białek w wybranych fazach cyklu i wczesnej ciąży. Hipoteza badawcza powinna być zatem adekwatnie zmodyfikowana.

Material i metody

W liczącym 19 stron rozdziale Doktorantka zamieściła schematy dwóch zastosowanych układów doświadczalnych oraz zawarła precyzyjnie sformułowany opis użytych w badaniach metod analitycznych. Analizę ekspresji genów i białek akwaporyn AQP1, AQP5 i AQP9 Autorka wykonała zarówno w modelu *in vivo* wykorzystując całe pęcherzyki jajnikowe oraz wyizolowane z nich wyspecjalizowane komórki pobrane od świń w wybranych fazach cyklu rujowego i wczesnej ciąży, jak też w modelu *in vitro*, w którym wyizolowane komórki ziarniste i komórki osłonki wewnętrznej utrzymywane były przez 72 h w pierwotnej hodowli indywidualnej, a także w ko-kulturze. Układ *in vitro* posłużył do scharakteryzowania modulacyjnego oddziaływania luteotropiny, folikulotropiny, somatotropiny i prolaktyny na ekspresję mRNA/białek wybranych akwaporyn AQP1, AQP5 i AQP9 a także do określenia potencjalnego wpływu tych hormonów przysadki na zmiany objętości komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego. W części analitycznej, dotyczącej określenia względnej ekspresji mRNA genów *Aqp1*, *Aqp5* i *Aqp9*, Doktorantka wyizolowała z pęcherzyków jajnikowych oraz z uzyskanych z nich komórek całkowite RNA i spektrofotometrycznie przeprowadziła jego identyfikację ilościową i jakościową. Następnie wykonała serie reakcji

odwrotnej transkrypcji, zaprojektowała zestawy starterów specyficznych dla trzech badanych i dwóch genów referencyjnych, przeprowadziła reakcję amplifikacji odpowiednich fragmentów cDNA w czasie rzeczywistym (qRT-PCR), wykonała elektroforezę otrzymanych produktów PCR, które, po izolacji z żelu, przygotowała do reakcji sekwencjonowania. W części analitycznej poświęconej badaniom na poziomie białka, Doktorantka wykorzystała metodę Bradforda (pomiar koncentracji białka całkowitego), metodę Western-blot (pomiar poziomu ekspresji specyficznych białek AQP1, AQP5 i AQP9) oraz metodę immunohistochemiczną (immunolokalizacja białek AQP1, AQP5 i AQP9 w pęcherzykach jajnikowych i określenie wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek AQP1 i AQP5 w komórkach ziarnistych i komórkach osłonki wewnętrznej średnich i dużych pęcherzyków jajnikowych). Do analizy zmian objętości komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej Doktorantka posłużyła się techniką mikroskopową. Wykorzystany w pracy wszechstronny warsztat badawczy został precyzyjnie opisany. Procedury są dokładne i przejrzyste oraz odpowiednio udokumentowane. Tekst zawiera informacje o sekwencjach specyficznych starterów, ich lokalizacji na genach i spodziewanej wielkości produktu PCR. Równie starannie udokumentowane są metodyki dotyczące indywidualnej hodowli komórek ziarnistych i komórek osłonki wewnętrznej oraz ich hodowli w ko-kulturze, jak też opis procedur Western-blot i immunohistochemicznej.

W opisie materiałów i metod zawarte są dokładne informacje o pochodzeniu wszystkich odczynników wykorzystanych w badaniach. Autorka zamieściła też informację dotyczącą zgody Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie do prowadzenia badań z wykorzystaniem zwierząt.

Pytania i uwagi

1. Na stronie 23, w opisie zwierząt powinno być użyte określenie „masa ciała” a nie jak napisano „ciężar”.
2. W badaniach dotyczących wpływu hormonów białkowych na ekspresję genów i białek wybranych akwaporyn, jak też na objętość komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej z pęcherzyków jajnikowych świni, wszystkie hormony przysadkowe podawano w stężeniu 100 ng/ml. Na jakiej podstawie dokonano takiego wyboru dawki eksperymentalnej? Czy wybór ten wynikał z danych literaturowych, czy też był konsekwencją wcześniejszych doświadczeń Zespołu?
3. Czy i jakich markerów wielkości użyto przy rozdziale elektroforetycznym białek?
4. Dlaczego w serii oznaczeń ekspresji *Aqp1*, *Aqp5* i *Aqp9* mRNA w całych pęcherzykach jajnikowych, a także w serii oznaczeń wykonywanych na materiale uzyskanym z hodowli indywidulanej komórek ziarnistych i komórek osłonki, genami referencyjnymi były GAPDH i 18S RNA wyszczególnione w tabeli 1 na stronie 28, natomiast w doświadczeniu

wykorzystującym ko-kultury komórek ziarnistych i osłonki, do oznaczenia ekspresji mRNA tych samych genów docelowych jako referencja posłużyły geny GAPDH i PPIA, wyszczególnione w tabeli 4 na stronie 36?

5. W podrozdziale 7 zamieszczonym na stronie 37 i dotyczącym analizy statystycznej znalazło się niefortunne sformułowanie' „Wartość ekspresji białek Aqp1, AQP5 i AQP9 () obliczono przy wykorzystaniu testu najmniejszych istotnych różnic”. Żaden test statystyczny nie mierzy wartości ekspresji.

Wyniki

Rozdział liczy 25 stron, a forma graficzna uzyskanych danych została zaprezentowana na 15 rycinach zawierających wykresy oraz na 5 rycinach ze zdjęciami odpowiednich preparatów immunohistochemicznych.

Pierwszym etapem badań Doktorantki wykorzystujących całe pęcherzyki jajnikowe wyizolowane w czterech fazach cyklu rujowego świni domowej (2-4 dzień, 10-12 dzień, 14-16 dzień, 18-20 dzień) oraz w dwóch fazach wczesnej ciąży (14-16 oraz 30-32), była immunohistochemiczna identyfikacja ekspresji białek akwaporyn AQP1, AQP5 i AQP9. Wyniki ujawniły obecność białka AQP1 w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych jajnika natomiast białek AQP5 i AQP9 w komórkach ziarnistych. Porównanie poziomu ekspresji badanych białek w wybranych fazach cyklu wykazało znaczący wzrost ekspresji AQP1 i AQP5 w 18-20 dniu cyklu. Badaniom na poziomie białka towarzyszyła - przeprowadzana zarówno w pęcherzykach integralnych jak i w wyizolowanych z nich komórkach ziarnistych i komórkach osłonki wewnętrznej - analiza aktywności wybranych akwaporyn na poziomie transkrypcji ich genów. Istotne nasilenie ekspresji *Aqp1*mRNA zaobserwowano w obu typach komórek pęcherzyka w 14-16 dniu cyklu i wzrost ten, jednak tylko w komórkach osłonki, utrzymywał się jeszcze w dniu 18-20. Dla genu *Aqp5* najwyższy poziom transkrypcji wystąpił w dniu 10-12 cyklu i pojawił się zarówno w komórkach ziarnistych jak i osłonki wewnętrznej. Ponowne zwiększenie ekspresji tego mRNA zaobserwowano w komórkach osłonki także w dniu 18-20. Również poziom *Aqp9* mRNA w komórkach ziarnistych zmieniał się w czasie cyklu, a jego najwyższa ekspresja pojawiła się w dniu 10-12. W żadnej z dwóch analizowanych faz ciąży i dla żadnego z badanych genów w żadnym typie komórek nie ujawniły się istotne statystycznie różnice w poziomie ekspresji mRNA.

W następnym etapie badań wykonanych w układzie *in vitro* i prowadzonych w indywidualnych hodowlach komórek ziarnistych i osłonki zewnętrznej wyizolowanych z pęcherzyków średnich i dużych, Doktorantka skupiła się na potencjalnie modulującym oddziaływaniu LH, FSH, PRL i GH na ekspresję genów i białek akwaporyn 1, 5, 9.

Zarówno w komórkach ziarnistych uzyskanych z pęcherzyków średnich jak i otrzymanych z pęcherzyków dużych, istotne nasilenie ekspresji *Aqp1* mRNA zaobserwowano po ich 24 godzinnej inkubacji w obecności FSH. W komórkach osłonki wewnętrznej stymulujący wpływ na ekspresję *Aqp1* mRNA wywarł natomiast hormon luteinizujący, jednak efekt ten dotyczył tylko komórek pochodzących z pęcherzyków dużych. W warunkach eksperymentalnych zapewniających funkcjonalny kontakt obu typów komórek (ko-kultura) pobudzający wpływ FSH na transkrypcję genu *Aqp1* utrzymywał się jedynie w komórkach ziarnistych izolowanych ze średnich pęcherzyków. W ko-kulturze komórek ziarnistych, pochodzących z pęcherzyków dużych, wzrost ekspresji *Aqp1* mRNA pojawił się po inkubacji z FSH. Hodowane w tych samych warunkach ko-kultury komórki osłonki wewnętrznej z pęcherzyków średnich i dużych zareagowały wzrostem poziomu *Aqp1* mRNA w obecności LH. Dodatkowo, w hodowli tej wzrost poziomu *Aqp1* mRNA stymulowany przez LH pojawił się też w komórkach osłonki pochodzących z pęcherzyków średnich.

Indukowanej przez FSH i LH stymulacji transkrypcji genu *Aqp1* towarzyszył, w adekwatnych, oddzielnie hodowanych typach komórek, wzrost ekspresji kodowanego przezeń białka. Ponadto, tylko w komórkach ziarnistych z pęcherzyków dużych, zaobserwowano stymulowane przez GH zwiększenie ekspresji białka AQP1, czemu nie towarzyszyła zmiana w poziomie ekspresji *Aqp1* mRNA. W porównaniu do obrazu uzyskanego w grupie kontrolnej, żaden z czterech badanych hormonów w żadnym zbadanych typów komórek nie wpłynął na zmianę subkomórkowej lokalizacji białka AQP1 identyfikowanego zawsze w części okołojądrowej cytoplazmy, endosomach oraz w błonie komórkowej.

Zróżnicowany komórkowo wpływ na ekspresję *Aqp5* mRNA dotyczył hormonu wzrostu. Jego obniżające działanie ujawniło się w komórkach ziarnistych pochodzących z pęcherzyków średnich a przeciwstawne, stymulujące, w komórkach osłonki z pęcherzyków dużych. Indukowany przez prolaktynę wzrost aktywności transkrypcyjnej tego genu zaobserwowano zarówno w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej jednak tylko pochodzących z pęcherzyków dużych. Natomiast w hodowli prowadzonej w warunkach ko-kultury, ekspresja *Aqp5* mRNA wzrosła w obecności hormonu luteinizującego, hormonu wzrostu i prolaktyny wzrostu i prolaktyny i efekty te zaobserwowano w komórkach ziarnistych z pęcherzyków dużych. W komórkach osłonki wewnętrznej pobranych z pęcherzyków średnich i dużych a następnie hodowanych w ko-kulturze, nasilenie aktywności transkrypcyjnej nastąpiło w obecności hormonu luteinizującego. Dodatkowo, w komórkach osłonki z pęcherzyków średnich podwyższoną ekspresję *Aqp5* mRNA spowodowała także prolaktyna.

Zwiększoną ekspresję białka AQP5 spowodowały natomiast prolaktyna i hormon folikulotropowy, a obserwowany wpływ wystąpił w hodowanych indywiduach komórkach

ziarnistych uzyskanych z obu typów pęcherzyka. W żadnym z badanych typów komórek nie pojawiły się indukowane przez hormony przysadkowe zmiany w subkomórkowej lokalizacji białka AQP5. Jego wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie utrzymywało się stabilnie w obrębie okolicy okołojądrowej, endosomów i w błonie komórkowej.

Trzecim badanym genem z rodziny akwaporyn był gen *Aqp9*. W indywidualnie prowadzonych hodowlach komórek wyizolowanych z pęcherzyków jajnikowych, zwiększoną transkrypcję genu *Aqp9* stwierdzono jedynie w komórkach osłonki pobranych z pęcherzyków średnich i następnie inkubowanych w obecności prolaktyny. W ko-kulturze komórek ziarnistych z pęcherzyków dużych obserwowano znaczący spadek ekspresji mRNA tego genu w obecności hormonów folikulotropowego, luteinizującego i prolaktyny. W ko-kulturze komórek osłonki wewnętrznej pochodzących z pęcherzyków średnich, stwierdzono obniżający wpływ hormonu wzrostu na aktywność transkrypcyjną *Aqp9*, natomiast w ko-kulturze komórek wyizolowanych z pęcherzyków dużych ujawniła się podwyższona ekspresja *Aqp9* mRNA po inkubacji z hormonem luteinizującym.

W osobnej, indywidualnej hodowli komórek ziarnistych i komórek osłonki wyizolowanych z pęcherzyków średnich i dużych, Doktorantka analizowała też wpływ hormonów przysadkowych na objętość tych komórek. Otrzymane wyniki ujawniły, że FSH, PRL i GH stymulują wzrost objętości komórek ziarnistych z obu typów pęcherzyka. Obecność farmakologicznego blokera akwaporyn nie zwiększała stymulowanej przez LH, PRL i GH objętości komórek osłonki wewnętrznej. Zahamowanie wzrostu objętości komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej indukowanego przez środowisko hipotoniczne w obecności farmakologicznego blokera aktywności akwaporyn wskazuje natomiast na znaczący udział AQP1 i AQP5 w transporcie wody przez te komórki.

Pytania i uwagi

1. W opisie wyników Doktorantka posługuje się terminem '„podstawowa ekspresja genu” nie wyjaśniając tego pojęcia. Trudno jest np. zrozumieć, co Autorka dokładnie miała na myśli pisząc: „Podstawowy poziom ekspresji mRNA w jajniku świni był zbliżony do ekspresji mRNA *Aqp1*...” (strona 44). Wyniki pomiaru względnej ekspresji mRNA poszczególnych genów zaprezentowane na rysunkach 4A i 4G, do których odsyła Autorka, nie pozwalają na wyciągnięcie takich wniosków porównawczych. W rzeczywistości zaprezentowany obraz ekspresji *Aqp1* i *Aqp9* mRNA w różnych fazach cyklu rujowego wskazuje na brak wpływu tych faz na profil transkrypcyjny a nie na wielkość ekspresji każdego z tych genów. Można dodać, że fazy cyklu nie miały też wpływu na ekspresję trzeciego z badanych genów, czyli *Aqp5* mRNA. Niefortunnie sformułowane jest też zdanie zawarte na stronie 43: „Poziom mRNA był nie istotny

w obu okresach ciąży” Statystycznie istotna może być tylko zmienność poziomu ekspresji mRNA.

2. Graficzny obraz wyników zaprezentowanych na wykresach jest niezbyt czytelny. Szkoda, że Autorka nie wykorzystała kolorów lub tekstur do zróżnicowania poszczególnych słupków. Dla czytelnika pracy pomocne byłyby też staranniejsze i jednolite pod względem formatu i rozmiaru czcionki przygotowane opisy osi i tytułów na poszczególnych panelach graficznych. Na przykład, rysunki 11, 12, 13 zawierają informację o rodzaju komórek i wielkości pęcherzyka, podczas gdy na rysunkach 14 i 15 nie ma informacji, które panele dotyczą komórek ziarnistych, a które komórek osłonki wewnętrznej.

3. Oznaczenia istotności statystycznej na rysunku 10C nie potwierdzają opisu zawartego na stronie 44 informującego, że: „ekspresja mRNA *Aqp9* w komórkach ziarnistych była istotnie wyższa w dniu 14-16 dnia cyklu rujowego w porównaniu do końca implantacji, dni 30-32”. Sądząc z rysunku 10C, można tylko przypuszczać, że istotna różnica w ekspresji tego mRNA pojawiła się pomiędzy dniem 10-12 cyklu a 30-32 dniem ciąży.

4. W całym tekście opisu wyników Autorka opisuje zaobserwowane zmiany, które jednak nie są istotne statystycznie. Na przykład, na stronie 49 znajduje się zdanie: „... w przypadku komórek osłonki wewnętrznej ze średnich pęcherzyków, poziom ekspresji badanego genu wykazywał wzrost, jakkolwiek nie istotny, po stymulacji PRL (rys 11C)”. Podobnie, na stronie 59 napisano: „Komórki osłonki wewnętrznej inkubowane z LH, PRL i GH oraz bez hormonów po zastosowaniu blokera AQP (+PMB) zwiększały swoją objętość w porównaniu do objętości wyjściowych, ale nie była to zmiana statystycznie istotna”. W moim przekonaniu nie powinno się opisywać zmian w poziomach badanych parametrów, jeżeli nie wykazują one cech istotności statystycznej.

5. Na stronie 41 Doktorantka podaje, że: „immunolokalizację białka AQP9 stwierdzono w komórkach ziarnistych pęcherzyków rozwijających się”. Z zamieszczonych fotografii na rysunku 5 wynika jednak, że białko to ulega ekspresji we wszystkich badanych okresach cyklu i ciąży.

6. W części badań dotyczącej udziału hormonów w regulacji ekspresji genów i białek akwaporyn w komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej, analiza ekspresji oraz subkomórkowej immunolokalizacji białka dotyczy tylko akwaporyny 1 i 5, natomiast nie obejmuje akwaporyny 9. Podobnie, nie analizowano wpływu hormonów na jego subkomórkową dystrybucję. Jaki był powód nieuwzględnienia białka AQP9?

Dyskusja

Szerokie spektrum otrzymanych danych Doktorantka omawia na 13 stronach tekstu. W przemyślany i logiczny sposób odnosi się do najważniejszych rezultatów swej pracy eksperymentalnej i umiejętnie konfrontuje je z danymi dostępnymi w najnowszym piśmiennictwie światowym z tej dziedziny. Wnikliwa i krytyczna interpretacja badań przekonuje o kompetencji Doktorantki w omawianej problematyce.

Pytania i uwagi

1. O jakiej akwaporynie w pęcherzykach jest mowa w Dyskusji w zdaniu na stronie 65, w którym Doktorantka powołuje się na pracę Prestona i wsp.?
2. Odnosząc się do otrzymanych wyników, Doktorantka na stronie 66 stwierdza: „Analizując wyniki przedstawionej pracy przypuszczamy, że w jajniku świni AQP1 i AQP5 ze względu na ich różną lokalizację: komórki śródbłonna naczyń kapilarnych i komórki ziarniste, białka te pełnią swoje ściśle określone funkcje”. Sprecyzowania wymaga o jakich „ściśle określonych funkcjach” białek AQP1 i AQP5 jest mowa w tym zdaniu.
3. Wyniki dotyczące profilu ekspresji *Aqp1* mRNA wykonane w niefrakcjonowanym pęcherzyku jajnikowym nie wykazały znaczących zmian w aktywności transkrypcyjnej tego genu pomiędzy czterema analizowanymi fazami cyklu. Jednak gdy analizowano aktywność transkrypcyjną genu *Aqp1* w poszczególnych typach komórek, to ekspresja tego mRNA zarówno w komórkach ziarnistych jak i osłonki wewnętrznej była w 14-16 dniu cyklu znacząco wyższa od odpowiednich poziomów stwierdzonych w dniach 2-4 oraz 10-12. Mimo to, w całym pęcherzyku nie wystąpiły różnice między dniami 14-16 a 2-4 i 10-12 dniami cyklu. W Dyskusji ten aspekt nie jest podnoszony. Jak, zdaniem Doktorantki można skomentować taki wynik?
4. Na stronach 72/73 Doktorantka podaje, iż: „Wydaje się, że ekspresja AQP1 i AQP5 w błonach komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej jest związana z metabolizmem wody w tych komórkach...”. Proszę o wyjaśnienie, co kryje się pod użytym określeniem „metabolizm wody”.
5. Częścią przyjętej hipotezy badawczej było założenie, że hormony przedniego płata przysadki: LH, FSH, PRL i GH mogą wpływać na subkomórkową dystrybucję akwaporyn w komórkach pęcherzyka jajnikowego. Otrzymane wyniki nie potwierdziły tej części hipotezy. Czy w świetle uzyskanych danych można, zdaniem Doktorantki, przyjąć rzeczywisty brak związku między oddziaływaniem hormonalnym a lokalizacją białek akwaporyn w badanych komórkach, czy też związku takiego wciąż nie można wykluczyć, jednak jego udowodnienie wymaga innego typu badań? Czy istnieją prace dotyczące zmian wewnątrzkomórkowej lokalizacji tych białek w innych typach komórek?

6. Ekspresję mRNA genów *Aqp1*, *Aqp5* i *Aqp9* po inkubacjach z hormonami przysadkowymi analizowano w komórkach ziarnistych i komórkach osłonki wewnętrznej. Badanie aktywności transkrypcyjnej tych genów wykonywano dwukrotnie: w indywidualnych hodowlach komórkowych oraz w hodowli w warunkach ko-kultury. Specyficzny, obserwowany w danym typie komórek wpływ hormonów na ekspresję wybranych m RNA w przeważającym stopniu różnił się w zależności od warunków hodowli (indywidualna vs ko-kultura) w jakich utrzymywano te komórki. Rodzi się więc pytanie, które z obserwowanych efektów hormonów przysadki wywieranych na ekspresję poszczególnych genów w konkretnych typach komórek i w konkretnych warunkach hodowli oddają rzeczywisty wpływ tych hormonów na specyficzną aktywność transkrypcyjną genów akwaporyn? Jak, zdaniem Doktorantki, można na tle fizjologicznym skomentować takie obserwacje?

Bibliografia

Bibliografia zawiera 146 pozycji, w tym 49 prac opublikowanych w ciągu ostatnich 10 lat (od 2007 roku), wśród których 18 pozycji ukazało się w latach 2012-2016. Cytacje zamieszczone w tekście pracy są alfabetycznie odzwierciedlone w spisie literatury.

Wnioski

Rozdział zawiera ujęte w formie 13 punktów, podsumowanie otrzymanych wyników. Jest to bardzo dobra rekapitulacja poczynionych obserwacji eksperymentalnych, jednak w moim przekonaniu, w obecnej formie nie można jej uznać za wnioski końcowe.

Do ich sformułowania konieczna jest synteza otrzymanych danych i odniesienie do przyjętej hipotezy badawczej.

WNIOSEK KOŃCOWY RECENZENTA

Zgłoszone uwagi i pytania nie zmieniają mojej końcowej, w pełni pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej. Reasumując, uważam, że praca Pani mgr Patrycji Magdaleny Młotkowskiej „Ekspresja wybranych akwaporyn w komórkach pęcherzyka jajnikowego świni (*Sus strofa f. domestica*)” spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie nr 595 o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych oraz Tytule i Stopniach Naukowych w Dziedzinie Sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U.Nr 65 z dnia 14. 04.2003) wraz z późniejszymi zmianami.

Zatem, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z prośbą o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Magdaleny Młotkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. n.biol. Alina Gajewska, prof. nadzwyczajny