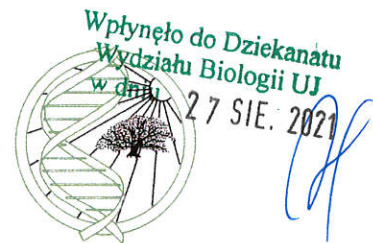


Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie

Wydział Biologii i Biotechnologii

Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt

ul. M. Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn, tel. 89-5233201, fax 89-5233937,



Prof. dr hab. Iwona Bogacka
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii UWM
10-719 Olsztyn
ul. Oczapowskiego 1A

Olsztyn, 24.08.2021 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Kurowskiej pt. *Expression and role of vaspin in porcine ovarian cells*

Ogólna charakterystyka

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Rozprawa została wykonana pod opieką naukową Pani dr hab. Agnieszki Rak, prof. nadzw., w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ. Rozprawę wykonano we współpracy międzynarodowej z dr Joelle Dupont, Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRAE, Francja. Analizie podlegał syntetyczny opis badań będących podstawą rozprawy doktorskiej, przygotowany w języku angielskim. W jego skład wchodzi: spis treści, streszczenie w języku angielskim i polskim, wstęp, opis celów i zadań badawczych, lista opublikowanych oryginalnych prac, publikacje wraz z oświadczeniami współautorów. Każda załączona anglojęzyczna publikacja jest zaopatrzona w 1-stronicowe streszczenie zawierające cel badań, uzyskane wyniki i podsumowanie. Kolejne rozdziały stanowią: dyskusja, podsumowanie i wnioski, a także informacja na temat finansowania prowadzonych badań oraz bibliografia. Moim zdaniem, praca zyskałaby na przejrzystości, gdyby publikacje wraz z oświadczeniami zostały umieszczone na końcu opracowania (w suplemencie), po dyskusji, podsumowaniu i konkluzjach.

Rozprawę stanowi zbiór pięciu artykułów naukowych – niżej wyszczególnionych – opublikowanych w wysoko punktowanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports*, których łączny wskaźnik *IF* wynosi 19,681; łączna liczba punktów *MNiE* wynosi 720, natomiast liczba cytacji wynosi 23 (na podstawie *Web of Science* z 8. czerwca 2021 r.).

- I. **Kurowska P**, Mlyczyńska E, Barbe A, Staub C, Gregoraszczyk E, Dupont J, Rak A. Vaspin in the pig ovarian follicles: expression and regulation by different hormones. *Reproduction*. 2019, 158(2): 135-146. (*IF* – 3,206; *liczba punktów MNiE* – 100)
- II. **Kurowska P**, Mlyczyńska E, Dawid M, Dupont J, Rak A. Role of vaspin in porcine ovary: effect on signaling pathways and steroid synthesis via GRP78 receptor and protein kinase A. *Biol Reprod*. 2020, 102(6): 1290-1305. (*IF* – 3,322; *liczba punktów MNiE* – 200)
- III. **Kurowska P**, Mlyczyńska E, Estienne A, Barbe A, Rajska I, Soból K, Poniedziałek-Kempny K, Dupont J, Rak A. Expression and Impact of Vaspin on In Vitro Oocyte

Maturation through MAP3/1 and PRKAA1 Signalling Pathways. *Int J Mol Sci.* 2020, 21(24): 9342. (IF – 4,556; liczba punktów MNiE – 140)

- IV. **Kurowska P**, Mlyczyńska E, Dawid M, Grzesiak M, Dupont J, Rak A. The role of vaspin in porcine corpus luteum. *J Endocrinol.* 2020, 247(3): 283-294. (IF – 4,042; liczba punktów MNiE – 140)
- V. **Kurowska P**, Mlyczyńska E, Dupont J, Rak A. Novel Insights on the Corpus Luteum Function: Role of Vaspin on Porcine Luteal Cell Angiogenesis, Proliferation and Apoptosis by Activation of GRP78 Receptor and MAP3/1 Kinase Pathways. *Int J Mol Sci.* 2020, 21(18): 6823. (IF – 4,556; liczba punktów MNiE – 140)

Wszystkie prace są zespołowe (4-9 autorów), jednakże we wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem. W oświadczeniach dołączonych do każdej publikacji Doktorantka wskazuje wiodący wkład w powstawanie każdej z nich, który wynosił od 50% (prace 1-4) do 60% (praca 5). Obejmował on m.in. udział w opracowaniu koncepcji badań i metodologii, pozyskiwanie materiału eksperymentalnego, wykonywanie analiz laboratoryjnych, analizę uzyskanych wyników oraz udział w przygotowaniu publikacji do druku. Badania były realizowane w ramach dwóch projektów finansowanych ze środków zewnętrznych (PRELUDIUM i HARMONIA) oraz środków statutowych rodzimej Jednostki.

Przedstawione do analizy opracowanie zawiera ponadto krótką charakterystykę dorobku naukowego Kandydatki, który w mojej ocenie jest bardzo wartościowy, bowiem obejmuje współautorstwo 13-tu publikacji oryginalnych z listy JCR (w tym 5 wchodzących w skład rozprawy doktorskiej), współautorstwo 5-ciu artykułów przeglądowych (w trzech z nich Doktorantka jest pierwszym autorem) i jeden rozdział w podręczniku [łączny IF dorobku naukowego wynosi 59,865; liczba cytowań – 112 (bez autocytowań – 74), indeks h – 7]. Na uwagę zasługuje także fakt, że Doktorantka pełniła funkcję kierownika w projekcie PRELUDIUM finansowanym ze środków zewnętrznych oraz uczestniczyła w realizacji projektu HARMONIA, kierowanego przez Panią promotor, dr hab. A. Rak, prof. UJ. Wyniki prowadzonych badań (nie tylko tych będących podstawą rozprawy doktorskiej) prezentowała w postaci 40-tu doniesień naukowych/prezentacji ustnych podczas konferencji krajowych i zagranicznych (aż w 22 jako pierwszy autor). Jest beneficjentką projektu ETIUDA, finansowanego przez NCN. Kilkukrotnie przebywała na krótkoterminowych stażach naukowych w laboratorium we Francji (finansowanie uzyskiwała z funduszy Towarzystwa Biologii Rozrodu oraz Rządu Francji), kilkakrotnie była także nagradzana za swoją naukową działalność, m.in. przez władze macierzystej Jednostki oraz Towarzystwo Biologii Rozrodu.

Analiza merytoryczna

Oceniana rozprawa doktorska dotyczy bardzo interesującej tematyki z zakresu endokrynologii rozrodu i obejmuje poznanie funkcji waspiny w różnych strukturach jajnika świni. Waspina, odkryta w 2005 roku, należy do grupy adipokin. Jej ekspresję potwierdzono dotychczas w różnych tkankach, m.in. tkance tłuszczowej, żołądku, wątrobie, trzustce, śliniankach czy podwzgórz, co świadczy o jej plejotropowym działaniu w organizmie. Jak wskazują badania, koncentracja tej adipokiny we krwi jest skorelowana z indeksem masy ciała (BMI) a także stężeniem glukozy. Waspina wykazuje działanie przeciwzapalne i antyaterogenne, ale także reguluje pobieranie pokarmu, poprawia tolerancję glukozy i zwiększa insulinowrażliwość, co wskazuje na jej możliwy protekcyjny charakter w otyłości i cukrzycy. Rola waspiny w regulacji procesów rozrodczych nie jest w pełni poznana, a dane literaturowe

na ten temat są skromne, dlatego badania podjęte przez Doktorantkę należy uznać za aktualne i odpowiednie jako przedmiot rozprawy doktorskiej. Prowadzenie badań w proponowanym obszarze naukowym jest szczególnie ważne i uzasadnione ze względu na znaną już zależność pomiędzy produkcją adipokina a metabolizmem energetycznym oraz płodnością samic. Badania te są również nowatorskie, ponieważ realizowane były w dużej części w ramach projektów finansowanych ze środków zewnętrznych, a nowatorstwo to element który jest wnikliwie analizowany przez spory zespół ekspertów i recenzentów.

W prezentowanej rozprawie Autorka przyjęła główną hipotezę zakładającą, że waspina jest nową adipokina, która jest zaangażowana w regulację procesów zachodzących w jajniku. W trzech bardziej szczegółowych hipotezach weryfikuje, że: 1) wisfatyna i receptor GRP78 są obecne w komórkach pęcherzyka jajnikowego oraz ciała żółtego jajnika świni, a ich ilość jest zależna od stanu fizjologicznego oraz stopnia otluszczenia zwierzęcia, 2) ilość wisfatyny w komórkach jajnikowych jest regulowana hormonalnie przez gonadotropiny, steroidy jajnikowe, prostaglandyny oraz insulinę, 3) wisfatyna jest istotnym regulatorem procesu steroidogenezy, dojrzewania oocytów w komórkach pęcherzykowych a także steroidogenezy, sekrecji prostaglandyn, proliferacji, apoptozy i angiogenezy w komórkach lutealnych jajnika świni. W celu zweryfikowania powyższych hipotez, Doktorantka zaplanowała realizację trzech złożonych celów badawczych. Badania prowadziła w warunkach *in vitro*, wykorzystując różne struktury jajnika – pęcherzyki jajnikowe, oocyty oraz ciała żółte. Materiał eksperymentalny pobierała od dwóch ras świń, Large White oraz Meishan, które różnią się istotnie stopniem otluszczenia ciała, jednak zdecydowana większość uzyskanych wyników dotyczy pierwszej z nich. Po wnikliwej analizie publikacji będących podstawą dysertacji należy podkreślić, że są one tematycznie oraz metodycznie spójne. Należy zwrócić szczególną uwagę na szeroki zakres badań (dwie rasy świń w różnych fazach cyklu rujowego, różne struktury jajnikowe, zróżnicowane układy eksperymentalne i czynniki doświadczalne) i stosowanych metod eksperymentalnych (hodowla *in vitro* komórek pęcherzyka jajnikowego, oocytów oraz ciała żółtego, real time-PCR, Western blot, immunohistochemia, ELISA, wyciszenie ekspresji genów oraz testy *in vitro* do analizy proliferacji i apoptozy komórek). Zastosowane w badaniach analizy laboratoryjne są nowoczesne i właściwie dobrane do założonych celów badawczych. Prawidłowo dobrano również analizy statystyczne do opracowania uzyskanych wyników.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania Pani mgr Patrycji Kurowskiej dostarczyły wielu nowych i oryginalnych danych. Za szczególnie istotne należy uznać:

1. wykazanie zróżnicowanej, zależnej od fazy cyklu rujowego i otluszczenia świni, ekspresji waspiny w pęcherzykach jajnikowych,
2. stwierdzenie istotnej roli waspiny w regulacji funkcji komórek pęcherzyka jajnikowego świni:
 - wykazanie stymulującego wpływu gonadotropin, steroidów, insuliny, insulinopodobnego czynnika wzrostu, IGF-1, na zawartość białka waspiny w komórkach pęcherzyka jajnikowego oraz w medium hodowlanym, a także wskazanie szeregu ścieżek sygnałowych z udziałem kinaz – ERK1/2, PI3K/Akt, Stat/JAK2 i AMPK α oraz czynnika jądrowego NF- κ B w działaniu waspiny,
 - wykazanie stymulującego wpływu waspiny, zależnego od czasu inkubacji, na fosforylację szeregu kinaz MAP3/1, AKT, STAT3, PRKAA1 i PKA, oraz hamującego na ekspresję NF κ B2 w komórkach pęcherzyka jajnikowego,
 - wykazanie stymulującego wpływu waspiny na sekrecję steroidów (P4 i E2) a także zawartość mRNA/białka STAR, enzymów steroidogenicznych (CYP11A1, CYP17A1,

HSD3B, CYP19A1), receptorów gonadotropin i steroidów (FSHR, LHCGR, PGR, ESR2) w komórkach pęcherzyka jajnikowego; wskazanie udziału receptora GRP78 oraz kinazy białkowej A w działaniu waspiny,

- wykazanie wpływu waspiny i udziału receptora GRP78 w dojrzewaniu oocytów *in vitro* a także stwierdzenie istotnej roli kinaz MAP3/1 oraz PRKAA1 w jej działaniu,

3. stwierdzenie istotnej roli waspiny w regulacji funkcji ciała żółtego świni:

- wykazanie zróżnicowanej zawartości mRNA/białka waspiny i receptora GRP78 w komórkach lutealnych, zależnej od aktywności ciała żółtego,
- wykazanie hamującego działania LH, P4 oraz prostaglandyn (PGF2 α i PGE2) na zawartość białka waspiny w komórkach lutelanych i jej wydzielanie do medium hodowlanego,
- wykazanie stymulującego działania waspiny na sekrecję steroidów (P4 i E2) a także ekspresję białka STAR, enzymów steroidogenicznych (CYP11A1, HSD3B, CYP19A1) w komórkach lutealnych; wskazanie udziału receptora GRP78 oraz kinazy białkowej A w działaniu waspiny,
- wykazanie udziału waspiny w syntezie prostaglandyn (wzrost sekrecji PGE2/PGF2 α oraz ilości białka PTGER1/PTGFR) w komórkach lutealnych; wskazanie udziału receptora GRP78 i kinazy MAP3/1,
- wykazanie stymulującego wpływu waspiny, zależnego od czasu inkubacji, na fosforylację kinaz MAP3/1 i PKA w komórkach lutealnych,
- wykazanie udziału waspiny w regulacji procesu angiogenezy (stymulujący wpływ na syntezę i wydzielanie czynników VEGFA, FGF2, ANGPT1 oraz na ekspresję białek receptorów VEGFR1, VEGFR2), proliferacji (stymulujący wpływ na ilość białka cykliny A oraz zawartość mRNA/białka PCNA), oraz apoptozy (hamujący wpływ na aktywność kaspaz 3 i 7 oraz zawartość mRNA i białka BAX/BCL2).

Prezentowane wyniki badań są bardzo interesujące, pozytywnie weryfikują przyjęte hipotezy i jednoznacznie wskazują, że waspina jest ważną nową adipokiną zaangażowaną w regulację wielu procesów zachodzących w jajniku. Uzyskane wyniki pozwoliły także na poznanie wewnątrzkomórkowych mechanizmów molekularnych zachodzących pod wpływem blokerów szlaków sygnalizacyjnych, dostarczając nowych strategii do kolejnych badań. W dyskusjach zamieszczonych w publikacjach będących podstawą dysertacji oraz w anglojęzycznym opracowaniu, Doktorantka wnikliwie interpretuje uzyskane wyniki, posiłkując się poglądowymi i klarownymi schematami prezentującymi możliwe mechanizmy działania waspiny w poszczególnych strukturach jajnikowych. Taki sposób prowadzenia dyskusji świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i ułatwia czytelnikowi interpretację wyników.

Uwagi i pytania

W ocenianej rozprawie trudno jest wskazać krytyczne uwagi, ponieważ prace naukowe opublikowano w prestiżowych czasopismach o międzynarodowym zasięgu i wysokich wskaźnikach bibliometrycznych, i z pewnością zostały rzetelnie ocenione przez szerokie grono recenzentów oraz edytorów poszczególnych redakcji czasopism. Niemniej jednak podczas analizy prac i opracowania rozprawy nasunęło mi się kilka uwag i z obowiązku recenzenta chciałabym się nimi podzielić, a które w żadnym stopniu nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy:

1. podsumowanie dyskusji rozprawy (str. 109 w opracowaniu anglojęzycznym) w formie opisowej nieco utrudnia konfrontację uzyskanych wyników z celami pracy przedstawionymi w opracowaniu. Wypunktowanie najważniejszych obserwacji/odkryć byłoby w tym przypadku bardziej adekwatne,
2. przy omawianiu uzyskanych wyników w poszczególnych rozdziałach opracowania (głównie w syntetycznych opisach publikacji, podsumowaniu i konkluzji), ale również w podpisach niektórych figur w publikacjach zabrakło informacji na temat fazy cyklu rujowego oraz rasy świni. Wydaje mi się, że jest to istotne, przynajmniej w przypadku fazy cyklu rujowego, ponieważ Doktorantka wykazuje istotne różnice w koncentracji waspiny w różnych strukturach jajnikowych, ale również w płynie pęcherzykowym i osoczu, właśnie w zależności od fazy cyklu rujowego. Na jakiej podstawie została wybrana ta sama faza cyklu rujowego (dni 10-12) do badań na komórkach z pęcherzyków jajnikowych oraz ciałek żółtych? Czy można sugerować, że wewnątrzkomórkowe mechanizmy regulacyjne w pozostałych okresach cyklu (np. podczas fazy pęcherzykowej) mogą być nieco inne i czy są przewidziane takie badania?
3. czy w streszczeniu polskojęzycznym opis świni rasy Large White dotyczy po prostu świni rasy wielkiej białej polskiej (WBP) czy jakiejś innej rasy? Zwracam na to uwagę, bo czasami w publikacjach Autorka stosuje „Large White” a czasami „Polish Large White”. Jeśli dotyczy to rasy polskiej, to proponowałabym stosowanie w streszczeniu polskojęzycznym jej nazwy w języku polskim,
4. figury 3-5 (A i B) w publikacji pierwszej są mało przejrzyste, ponieważ po pierwsze – nie prezentują zestawienia wyników Western blot w kolumnach z uwzględnieniem SEM (A), a po drugie – istotne różnice statystyczne są prezentowane w różny sposób, tj. część A (Western blot) za pomocą gwiazdek a część B (ELISA) za pomocą liter, mimo że układy doświadczalne są podobne,
5. figura 6A w publikacji czwartej prezentuje efektywność wyciszenia receptora GRP78 w komórkach lutealnych za pomocą siRNA. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie GRP78 siRNA w koncentracjach 1 lub 2 nM wprawdzie istotnie hamowało ekspresję białka w sposób zależny od dawki, ale zwróciłam uwagę na dosyć istotne różnice w zawartości białka referencyjnego aktyny. Czy obniżenie aktywności receptora o mniej niż 50 % (przy koncentracji 2 nM) można uznać za w pełni satysfakcjonujące? Chciałabym zapytać, czy przeprowadzono też analizę ilości mRNA i czy inne rozwiązania metodyczne były brane pod uwagę (np. zastosowanie specyficznych antagonistów receptora, innych metod wyciszania genu lub zwiększonych koncentracji siRNA)?
6. w 1-stronicowym opisie wyników publikacji I, III, IV, określenia „vaspin signal was observed in ...” lub „vaspin and GRP78 signal was detected in...” są nieprecyzyjne; domyślam się, że Autorka miała na myśli obecność białka wykrywanego za pomocą metody immunohistochemicznej,
7. gdyby Pani uzyskała wysokobudżetowy projekt naukowy, to jaki problem badawczy byłby przedmiotem Pani badań w najbliższej przyszłości i dlaczego?

Podsumowanie

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że wyniki zawarte w ocenianej rozprawie są nowe i oryginalne. W sposób istotny wzbogacają one istniejącą wiedzę w informacje na temat roli adipokin w biologii jajnika. Dostarczają nowych danych na temat obecności waspiny, a także jej roli w regulacji procesów zachodzących w różnych strukturach jajnika świni. Uważam,

że oceniana rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom naukowy, a uzyskana przez Doktorantkę ogromna ilość wyników, zaprezentowana w pięciu publikacjach, mogłaby być podstawą nawet dwóch rozpraw doktorskich. Doceniam bardzo szeroki zakres prowadzonych badań naukowych oraz kompleksowe podejście do rozpatrywanego problemu. Badania były pracochłonne i wymagały od Doktorantki dużego zaangażowania. Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem szerokiego warsztatu badawczego opartego o nowoczesne metody z zakresu biologii molekularnej, zrozumieniem rozpatrywanych zagadnień i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Opublikowane prace, a także opracowanie, będące podstawą rozprawy doktorskiej, zostały starannie przygotowane. Na uwagę zasługuje także całościowy, bogaty dorobek publikacyjny Doktorantki oraz uzyskanie finansowania na realizowanie badań w ramach projektu PRELUDIUM.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Expression and role of vaspin in porcine ovarian cells” w pełni spełnia wymogi określone w artykułe 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 2005 r. Nr 164, poz. 1365; z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz. 455) i zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Kurowskiej oraz dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników, ich nowatorski charakter, a także dużą aktywność publikacyjną Doktorantki oraz skuteczność w pozyskiwaniu funduszy na badania pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy.

Jacek Bejda