Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii i Biotechnologii

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Kingi Aleksandry Orzechowskiej została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Niny Smolińskiej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Praca doktorska była realizowana przy wsparciu finansowym pochodzącym z grantu Narodowego Centrum Nauki OPUS 13 nr 2017/25/B/NZ9/00040, którego kierownikiem była Promotorka pracy doktorskiej Pani prof. dr hab. Nina Smolińska oraz Programu Rozwojowego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego POWER.03.05.00-00-Z310/17 współfinansowanego przez Unię Europejską.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy opisania zmian zachodzących na poziomie transkryptomu oraz proteomu błony śluzowej macicy świni domowej *Sus scrofa domestica* L. w okresie implantacji. Tematyka pracy doktorskiej tym samym koncentruje się na niezwykle istotnym dla gospodarki zagadnieniu związanym z charakterystyką molekularnych procesów odpowiedzialnych za metabolizm oraz funkcje rozrodcze jednego z najważniejszych zwierząt hodowlanych w Polsce. W szczególności Doktorantka zajęła się oceną wpływu adipokininy - chemeryny na zdolność modulowania transkryptomu oraz proteomu błony śluzowej świni domowej, co według Doktorantki może mieć znaczenie dla prawidłowego przebiegu implantacji.

Postawiony cel naukowy spełnia tym samym wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ jego realizacja istotnie poszerza dotychczasową wiedzę oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Rozprawę doktorską Pani mgr Kingi Aleksandry Orzechowskiej stanowi zbiór 2 artykułów opublikowanych w 2022 roku w recenzowanych zagranicznych czasopismach

ul. Pigonia 1, 35-310 Rzeszów
tel./fax: +48 17 851 85 10
e-mail: sekretariat.ibb.cn@ur.edu.pl

znajdujących się w aktualnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MEiN. Są to następujące prace:

Orzechowska K, Kopij G, Paukszto L, Dobrzyn K, Kiezun M, Jastrzebski J, Kaminski T, Smolinska N. Chemerin effect on transcriptome of the porcine endometrium during implantation determined by RNA-sequencing. Biol Reprod. 2022 Mar 25:ioac063. doi: 10.1093/biolre/ioac063.

Orzechowska K, Dobrzyń K, Kieżun M, Malinowska A, Świderska 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. doi: 10.3390/cells11071161.

Prezentacja zbioru artykułów została poprzedzona w języku polskim oraz angielskim, streszczeniem pracy doktorskiej, wstępem, opisem hipotezy, celu naukowego, zakresu badań, wykorzystanego materiału oraz użytych metod, syntetycznym przedstawieniem głównych wyników, a także rozdziałem poświęconym ograniczeniu badań, podsumowaniem i wnioskami, jak również bibliografią wykorzystaną do przygotowania w/w omówienia. Do pracy załączono oświadczenia Doktorantki oraz współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej opisujące rolę Doktorantki oraz współautorów w postawaniu w/w publikacji.

Oba powyżej wymienione artykuły, tj. opublikowane w Biology of Reproduction oraz Cells to prace prezentujące oryginalne wyniki eksperymentalne, w których Doktorantka zajmuje miejsce pierwszego autora. Wkład autorski mgr Orzechowskiej w powstanie pierwszej oraz drugiej z cyklu prac polegał na opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, analizie i zarządzeniu danymi, opracowaniu i walidacji wyników, przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz udzieleniu odpowiedzi recenzentom podczas procesu publikacji.

Udział pozostałych autorów w/w publikacji polegał na „współudziale w walidacji wyników, współudziale w zarządzaniu danymi i wizualizacją wyników, współudziale w przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, współudziale w analizie danych, merytorycznym nadzorze nad wykonywanymi analizami i opracowaniami wynikami, opracowaniu koncepcji i metodyki badań, pozyskania środków na badania, pobieraniu materiału badawczego i przeprowadzeniu badań laboratoryjnych, koordynowaniu analiz i opracowywaniem wyników oraz współudziale w przygotowaniu publikacji do druku".

Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii i Biotechnologii

W związku z tak zdefiniowanym przez Doktorantkę oraz pozostałych współautorów wkładzie pracy pomocna w tym miejscu byłaby raczej szczegółowa charakterystyka wykonanych prac każdego z autora np. w jakim konkretnie typie analiz uczestniczył, na jakiej rycinie jego wyniki zostały zaprezentowane? W ocenie recenzenta porównując zakres prac wykonanych przez Doktorantkę oraz pozostałych autorów, nie można precyzyjnie określić zakresu prac wykonanych samodzielnie przez Doktorantkę. Dla przykładu Doktorantka oświadczyła, że jej udział polegał na „opracowaniu koncepcji i metodyki badań", takie same oświadczenie złożyła Promotorka pracy doktorskiej. Dlatego należy to bardziej doprecyzować w jakim zakresie Doktorantka autorsko opracowała koncepcję zaprezentowaną w publikacjach oraz w zakresie metodyki. Podobne uwagi można również mieć również do pozostałych zapisów oświadczenia Doktorantki w odniesieniu do oświadczeń wszystkich współautorów.

Chciałbym jednak zaznaczyć, że nie mam wątpliwości, co do wiodącego udziału Doktorantki w powstaniu w/w publikacji wchodzących w skład doktoratu. Należy podkreślić, że Doktorantka jest pierwszym wiodącym autorem w obu w/w publikacjach, a jej wiodący udział został odnotowany i tym samym zaakceptowany przez wszystkich współautorów w sekcji „Authors' contribution" w każdej z prac. Oczywiście w publikacjach w związku z określonymi przez wydawnictwo limitami oraz stylem często nie ma możliwości podania szczegółów w zakresie przygotowywania prezentowanych wyników. W pracy doktorskiej w zakresie oświadczeń należałoby określić także szczegółowo jakie etapy pracy badawczej były planowane oraz wykonane przez Doktorantkę, jakiego typu dane otrzymała, które zaprezentowane dane przeanalizowała samodzielnie, jakiego typu analizy wykonała, na jakich wykresach, rycinach lub w tabelach zostały one zaprezentowane, która część pracy została napisana samodzielnie przez Doktorantkę.

Poczyniona krytyka formy oświadczeń nie stanowi w ocenie recenzenta podstawy aby z powyżej opisanego powodu zdyskwalifikować którąkolwiek z publikacji z przedstawionego do oceny cyklu.

Wszystkie załączone prace stanowią spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych określanych przez ministra właściwego do spraw nauki, tym samym warunek ustawowy jaki powinna spełniać praca doktorska w tym zakresie należy uznać za spełniony.

Pierwsza praca zatytułowana „Chemerin effect on transcriptome of the porcine endometrium during implantation determined by RNA-sequencing" dotyczyła charakterystyki

ul. Pigonia 1, 35-310 Rzeszów
tel./fax: +48 17 851 85 10
e-mail: sekretariat.ibb.cn@ur.edu.pl

profilu transkrypcyjnego genów komórek hodowanych *in vitro* skrawków błony śluzowej macicy pozyskanych od 5 zwierząt w 15-16 dniu ciąży, tj. okresie implantacyjnym. W pracy tej wykorzystując Platformę NGS Illumina NovaSeq 6000 zidentyfikowano 130 genów wykazujących zmiany ekspresji w odpowiedzi na obecność chemeryny, w tym 58 genów wykazujących wzrost ekspresji w odpowiedzi na chemerynę oraz 72 geny wykazujące spadek ekspresji. Istotnym elementem tej pracy było także opisanie 386 transkryptów (274 genów kodujących białka oraz 2 lncRNA), w obrębie których zidentyfikowano alternatywne miejsca splicingowe, a także zidentyfikowanie 12 długich niekodujących RNA (lncRNAs), których poziom również zależał od obecności chemeryny. W pracy wykazano, że geny, których ekspresja ulega zmianie w odpowiedzi na chemerynę uczestniczą w regulacji procesów migracji komórek, adhezji, angiogenezy, produkcji interleukin, a także steroidogenezy. Zmiany w poziomie ekspresji wybranych genów zostały poddane dodatkowej walidacji z wykorzystaniem qPCR. Podobnie za pomocą PCR w pracy sprawdzono poziom wytypowanych alternatywnych form splicingowych transkryptów *CD44* oraz *SELONOI.*

Otrzymane dane zostały także zdeponowane w European Nucleotide Archive database. Druga praca z cyklu zatytułowana „Chemerin Effect on the Endometrial Proteome of the Domestic Pig during Implantation Obtained by LC-MS/MS Analysis" dotyczyła oceny wpływu chemeryny na profil proteomiczny błony śluzowej macicy świni w okresie implantacji za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). W ramach tej części doktoratu, Doktorantka wraz współautorami wykazała zmiany w poziomie 352 białek zaangażowanymi w regulacje takich procesów jak migracja komórek, proliferacja limfocytów T, adhezja komórek, połączenia komórkowe, a także metabolizm komórkowy czy organizacja cytoszkieletu. W obrębie wytypowanych białek wykazano, że 164 odznaczało się wyższym poziomem, a 188 mniejszym poziomem w odpowiedzi na chemerynę w stosunku do układu kontrolnego. Na stronie wydawnictwa zamieszczono także plik z dodatkowymi szczegółowymi danymi oraz wykonanymi analizami proteomu wraz z przypisanymi adnotacjami.

Podsumowując recenzent ocenia wysoko wartość merytoryczną wszystkich artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Należy zaznaczyć, że otrzymane wyniki podlegały rygorystycznym procedurom specjalistycznej recenzji zewnętrznej oraz przez członków rad redakcyjnych, w których zostały opublikowane. Opis wykorzystanych układów eksperymentalnych oraz zastosowanych technik w artykułach prezentujących oryginalne

Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii i Biotechnologii

wyniki został dokonany z należytą starannością lub z właściwymi odnośnikami literaturowymi i pozwala na dokładne prześledzenie wszystkich etapów przeprowadzonych eksperymentów. Zastosowane metody zostały dobrane i użyte odpowiednio dla weryfikacji hipotezy badawczej oraz osiągnięcia zdefiniowanych przez Doktorantkę celów pracy doktorskiej. Recenzent nie ma wątpliwości, że jakość merytoryczna oraz zastosowane metody świadczą o bardzo dobrym warsztacie Doktorantki. Forma prezentacji wyników oraz ich opis w artykułach naukowych została usystematyzowana w sposób tworzący logiczny ciąg zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowane w artykule oraz pracy doktorskiej cele.

Wysoko oceniam też krytyczne odniesienie się do własnych analiz w rozdziale 5 zatytułowanym „Ograniczenia badań". Doktorantka zaprezentowała w nim krytyczne spojrzenie na układ badawczy, a także problemu związanego z integracją danych otrzymanych podczas zaawansowanych analizy transkryptomu oraz proteomu. Przedstawiona autokrytyka, w tym rozdziale świadczy o dużej dojrzałości Doktorantki oraz odpowiedzialności za otrzymane wyniki.

W związku z pewnymi rozbieżnościami pomiędzy wynikami dotyczącymi analizy poziomu ekspresji genów oraz białek w odpowiedzi na chemerynę prosiłbym aby Doktorantka odniosła się jakie ewentualnie inne mechanizmy potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów mogą być odpowiedzialne za nie poza tymi związanymi z miRNA.

Podsumowując, w trakcie realizacji pracy doktorskiej Pani mgr Orzechowska potwierdziła, że chemeryna moduluje profil transkrypcyjny i proteomiczny błony śluzowej macicy świni wpływając na proces migracji komórek, adhezji komórek, angiogenezę odpowiedź immunologiczną, steroidogenezę oraz odpowiedź na progesteron. Tym samym Doktorantka dowiodła, ze chemeryna jest ważnym czynnikiem integrującym procesy metaboliczne, odpornościowe i rozrodcze zachodzące w błonie śluzowej świni w okresie implantacji.

Zakres i jakość zaprezentowanych wyników wskazuje, że Doktorantka przedstawiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i tym samym spełniła ustawowy warunek stawiany pracom doktorskim.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji chciałbym stwierdzić, iż mimo moich uwag, bardzo wysoko oceniam przedstawioną pracę doktorską Pani mgr Kingi Aleksandry Orzechowskiej

ul. Pigonia 1, 35-310 Rzeszów
tel./fax: +48 17 851 85 10
e-mail: sekretariat.ibb.cn@ur.edu.pl

oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim, ponieważ udowodniła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne; Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o dopuszczenie Pani mgr Kingi Aleksandry Orzechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową wyników oraz opublikowane prace wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 28/07/2022

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR