Dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ
Pracownia Fizjologii i Toksykologii Rozrodu
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
Tel. 012 664 50 03
agnieszka.rak@uj.edu.pl

Kraków, dn. 24.08.2023 r.

R E C E N Z J A PRACY DOKTORSKIEJ MGR MARKA ADAMOWSKIEGO

pt. „Wpływ szlaku sygnałowego leptyny na zmiany ekspresji genów i białek inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy"

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Immunologii i Patologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademik Nauk w Olsztynie, pod opieką naukową Pana Promotora dr hab. n. wet. António Miguel Galvão. Badania do pracy doktorskiej wykonano w oparciu o środki finansowe pochodzące z Narodowego Centrum Nauki (NCN), projektu SONATA 5: 2014/15/D/NZ4/01152, kierownictwa Pana Promotora.

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 164 strony i jest podzielona tradycyjnie na Wstęp, Hipotezę i Cele badawcze, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Wnioski. Dodatkowo każdy z rozdziałów złożony jest z kilku podrozdziałów. Na początku rozprawy umieszczono informację o publikacjach głównego autorstwa Pana mgr Marka Adamowskiego wyników badań ujętych w doktoracie. Pierwsza opublikowana praca pt. „*Leptin Signaling in the Ovary of Diet-Induced Obese Mice Regulates Activation of NOD-Like Receptor Protein 3 Inflammasome*" ukazała się w 2021 roku w czasopiśmie *Frontiers in Cell and Developmental Biology* o współczynniku IF 6,081 (100 pkt Ministerstwa Edukacji i Nauki). Publikacja ta ukazała się w recenzowanym czasopiśmie, zajmującym wiodącą pozycję w swojej dyscyplinie, była więc już oceniana zarówno pod względem metodycznym, precyzji układu doświadczalnego, adekwatności stosowanych metod, jak i merytorycznym, poziomu dyskusji wyników i wyciągania wniosków. Druga publikacja również pierwszego autorstwa Doktoranta pt. „*Ovarian leptin signalling regulates NLRP3 inflammasome activation and macrophage infiltration in*

a cell specific manner" jest w trakcie procesu recenzowania i jest dostępna online w formie „preprint", przed drukiem. Obie publikacje są współautorskie (6-7 autorów), a na podstawie informacji umieszczonych w artykułach wkład Doktoranta w ich powstanie jest znaczący i obejmuje udział w m.in. wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu tekstu manuskryptu. Następnie w kolejnej części dysertacji Autor przedstawia Spis treści, pięciostronicowy Wykaz skrótów oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim a rozprawę kończy rozdziałem Podsumowanie i Wnioski. Bogaty spis literatury cytowanych w doktoracie prac liczy aż 280 pozycji oraz dodatkowe suplementy.

Ocena merytoryczna

Tematyka rozprawy doktorskiej jest nowatorska, oryginalna i bardzo ciekawa a jej celem jest określenie ekspresji mRNA i białka elementów szlaku inflamasomu NLRP3 w jajnikach i wątrobie otyłych myszy, w szczególności oddziaływania ze szlakiem sygnałowym leptyny. Przedmiotem zainteresowania Autora jest m.in. regulacja funkcji jajnika w otyłości. Według najnowszych danych raportu Światowej Organizacji Zdrowia nadwaga i otyłość dotyczą prawie 60 % dorosłych i niemal co trzeciego dziecka. Dane pokazują, że choroba ta osiągnęła już rozmiar epidemii i jest przyczyną 200 tys. przypadków raka oraz 1,2 miliona zgonów rocznie. Negatywny wpływ otyłości został opisany u kobiet, dotyczy on przede wszystkim dysregulacji cyklu menstruacyjnego, zaburzeń miesiączkowania, braku owulacji a w konsekwencji prowadzi do niepłodności. W obrębie jajników podczas otyłość występuje stan zapalny, czego efektem jest obniżenie jakości oocytów, zaburzenia syntezy hormonów czy uszkodzenie mitochondrium. Dlatego też ważne i istotne z punktu profilaktyki i leczenia niepłodności kobiet są badania mechanizmów molekularnych zachodzących w komórkach jajnika. Dodatkowo, podczas otyłości obserwujemy rozrost tkanki tłuszczowej, co skutkuje zwiększoną produkcją leptyny. Od wielu lat prowadzone są badania nad wpływem leptyny na regulację funkcji rozrodczej zarówno kobiet jak i wielu gatunków zwierząt. U genetycznie otyłych i bezpłodnych myszy (*ob/ob*) egzogenna leptyna przywraca płodność samic. U dorosłych szczurów leptyna stymuluje zarówno uwalnianie gonadoliberyny z podwzgórza, jak i hormonu luteinizującego z przysadki. Leptyna wpływa również bezpośrednio na czynność jajników poprzez udział w rozwoju komórek pęcherzyka jajnikowego, dojrzewaniu oocytu, owulacji i tworzenia ciałka żółtego. Dostępne dane literaturowe wskazują również na bezpośredni wpływ leptyny na regulację ekspresji genów zaangażowanych w procesy proliferacji, apoptozy czy steroidogenezy jajnikowej. Wcześniejsze badania Zespołu dr hab. n. wet. António Miguel Galvão wykazały także powstawanie leptynooporności w jajnikach otyłych myszy. Jednak brak jest danych molekularnej regulacji stanu zapalnego w jajniku otyłych samic oraz charakterystyki szlaku inflamasomu NLRP3. Stąd, pozytywnie oceniam wybór tematyki pracy doktorskiej, jest on logiczną konsekwencją wcześniejszych obserwacji, zmierzającą do pełnego zrozumienia mechanizmów niewydolności jajników podczas rozwoju otyłości, co w przyszłości może wyjaśnić problemy niepłodności kobiet. W mojej ocenie, kolejnym ważnym elementem potwierdzającym bardzo istotny i nowatorski charakter badań Pana mgr Marka Adamowskiego jest fakt, że jego doktorat finansowany był z projektu badawczego Pana Promotora, który został poddany wnikliwej recenzji i uzyskał finansowanie przez NCN.

Obszerny Wstęp liczący 25 stron stanowi szczegółowe wprowadzenie do zagadnień poruszanych w rozprawie doktorskiej. Składa się z sześciu podrozdziałów. W pierwszym podrozdziale Doktorant opisuje regulację apetytu uwzględniając w szczegółach układ oreksygeniczny i anoreksygeniczny w neuronach podwzgórza wzbogacając ryciną regulacji apetytu. Następnie w drugim podrozdziale przechodzi do opisu tkanki tłuszczowej, jej podziału oraz budowy i funkcji adipocytów; ten

podrozdział wzbogaca również ryciną rozmieszczenia tkanki tłuszczowej u ludzi i myszy. W kolejnych podrozdziałach dokładnie opisuje komórki układu oporności owego w tkance tłuszczowej, funkcję endokrynną tkanki tłuszczowej oraz szlak sygnałowy leptyny. Kolejny podrozdział Pan mgr Marek Adamowski poświęcił na przedstawienie budowy i aktywacji inflamasomu NLRP3, wzbogacając również ryciną ten podrozdział. Opis układ rozrodczego Doktorant podzielił na kolejne podrozdziały opisując cykl płciowy u myszy, regulację hormonalną wzrostu pęcherzyków jajnikowych, rolę interleukin IL-1β, IL-18 w jajniku, wpływ otyłości na funkcjonowanie jajnika oraz rolę leptyny w patogenezie dysfunkcji jajników podczas otyłości. Wstęp Doktorant kończy opisem wpływu zaburzeń metabolizmu na aktywność inflamasomu NLRP3. Poszczególne zagadnienia Autor przedstawił w bardzo szczegółowy sposób, co wskazuje na dobrą znajomość literatury dotyczącej tematyki pracy doktorskiej oraz umiejętności doboru i korzystania z właściwego piśmiennictwa. Dodatkowo podrozdziały wzbogacone są czytelnymi rycinami, co znacznie ułatwia zrozumienie tematyki pracy. Jednak w mojej opinii w tej części rozprawy doktorskiej panuje chaos; np. w podrozdziale funkcja endokrynna tkanki tłuszczowej (1.2.2) Autor charakteryzuje leptynę, następnie w kolejnym rozdziale (1.3) przedstawia szlak sygnałowy leptyny a w podrozdziale 1.5.4.1 opisuje rolę leptyny w patogenezie dysfunkcji jajnika. Moim zdaniem, podrozdział 1.1. regulacja apetytu, 1.2 charakterystyka tkanki tłuszczowej oraz 1.2.1 – komórki układu odpornościowego w tkance tłuszczowej mogłyby być pominięte, ponieważ w kontekście badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej nie wnoszą szczególnie istotnych danych skłaniających do postawienia hipotezy, np. opis szlaku melanokortyny czy opis rozmieszczenia tkanki tłuszczowej w organizmie jest zbędny. Natomiast, biorąc pod uwagę to, że Doktorant jako cel pracy obrał badania regulacji inflamasomu NLRP3 w jajniku, w tym rozdziale zabrakło mi dokładniejszego opisu aktualnej wiedzy dotyczącej udziału inflamasomu NLRP3 w regulacji funkcji jajnika w fizjologii czy patologii; Autor zacytował jedynie trzy prace wskazujące na rolę inflamasomu NLRP3 w owulacji, patofizjologii PCOS czy obniżonej płodności związanej z wiekiem bez podania detali tych artykułów. Moim zdaniem ta część Wstępu powinna być bardziej szczegółowo opisana o dostępne dane literaturowe wskazujące na udział inflamasomu NLRP3 np. w przedwczesnym wygaszaniu jajników (Chen i współ., 2023), nowotworze jajnika (Luborsky i współ., 2020), dysfunkcji komórek warstwy ziarnistej kobiet otyłych (Xu i współ., 2023). Kolejna uwaga dotyczy stosowanych skrótów: na str. 33 Autor opisując budowę komórek pęcherzyka jajnikowego wyjaśnia, że komórki warstwy wewnętrznej osłonki to *theca cells*, bardziej precyzyjne jest określenie *theca interna cells*, a z kolei komórki warstwy zewnętrznej osłonki to *theca externa cells.* W opisie syntezy estradiolu wkradł się błąd, to nie enzym 3βHSD bierze udział w przekształceniu androstendion do estadiolu w komórkach warstwy ziarnistej, tylko oprócz CYP19A1 ważny jest enzym 17βHSD, który bierze udział w syntezie estronu do 17β- estradiolu.

Kolejny rozdział rozprawy doktorskiej Pana mgr Marka Adamowskiego przedstawia Hipotezę i Cele badawcze. Na podstawie przedstawionej we Wstępie literatury Doktorant jasno sformułował hipotezę, która zakłada, że szlak sygnałowy leptyny pośredniczy w regulacji inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy. W dalszej części tego rozdziału podane zostały cele szczegółowe pracy doktorskiej:

- określenie ekspresji mRNA i białka szlaku inflamasomu NLRP3 podczas fazy estrus i diestrus w jajniku myszy;

- określenie wpływu szlaku sygnałowego leptyny na regulację aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy: indukowanej dietą (DIO), uwarunkowanej genetycznie (myszy pozbawione genu leptyny – *ob/ob* i receptora leptyny – *db/db*) oraz farmakologicznej hiperleptynemii. W mojej opinii

wyraz aktywność powinien być zmieniony na „ekspresji mRNA i białka szlaku" ponieważ Doktorant nie analizował aktywność badanych cząsteczek szlaku inflamasomu NLRP3 tylko ich poziom transkryptu i białka.

- zbadanie transkryptomu komórek warstwy ziarnistej myszy *ob/ob* i *db/db;*

- określenie wpływu leptyny na ekspresję szlaku inflamasomu NLRP3 w komórkach wzgórka jajonośnego we wczesnej fazie otyłości oraz wątrobie otyłych myszy. Tutaj nasunęła mi się myśl, czy tytuł rozprawy doktorskiej nie powinien brzmieć *„Wpływ szlaku sygnałowego leptyny na zmiany ekspresji genów i białek inflamasomu NLRP3 w jajnikach i wątrobie otyłych myszy".*

W następnym rozdziale Materiał i Metody Doktorant w sześciu podrozdziałach opisuje model badawczy na którym przeprowadził swoje eksperymenty i użyte metody. Ten rozdział rozpoczyna opisem zwierząt użytych w doświadczeniach czyli myszy szczepu dzikiego C57BL/6J oraz transgeniczne myszy z nokautem genu leptyny (*ob/ob*) i receptora leptyny (*db/db*). Tutaj proszę o uzupełnienie informacji z jakiej firmy pochodziły zwierzęta użyte do badań i jakie były kryteria wykluczenia zwierząt z eksperymentu? Następny podrozdział to opis zadań badawczych, nazwanych analogicznie jak wskazane wyżej cele badawcze. Ten podrozdział zasługuje na pochwałę, ponieważ Doktorant bardzo dobrze przemyślał i kompleksowo przedstawił każde zadanie badawcze na wspólnej rycinie, co bardzo ułatwia odbiór i porządkuje liczne eksperymenty. Bardzo dobrze i dokładnie zostały opisane wszystkie metody analityczne oraz analiza statystyczna. Zastosowany w badaniach model myszy dzikich i transgenicznych oraz szereg różnorodnych analiz laboratoryjnych (wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomu, real time PCR, Western blot, ELISA, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego, barwienie immunohistochemiczne i immunofluorescencje oraz testy statystyczne) zostały prawidłowo dobrane do założonych celów badawczych i wymagały ogromnego nakładu pracy Doktoranta, co zasługuje na uznanie i pochwałę. Jednak, w tej części pracy nasuwa mi się kilka pytań i proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do nich:

- na jakiej podstawie w zadaniu 1 Doktorant wykluczył fazę proestrus cyklu estralnego z układu eksperymentalnego?

- czy dawka leptyny 100 µg/dzień (zadanie 2) była ustalona na podstawie wcześniejszych badań Autora (jeżeli tak to jakich?) czy literatury?

- czy wyniki z analizy transkyptomicznej (zadanie 3) były walidowane? Np. na poziomie transkryptu lub białka wybranych genów;

- czy Doktorant rozważał analizy wpływu leptyny na transkryptom w komórkach warstwy ziarnistej (zadanie 3) lub komórek lutealnych jajnika myszy?

- czy Doktorant brał udział we wszystkich analizach bioinformatycznych uzyskanych wyników? Czy korzystał z pomocy bioinformatyka?

- dlaczego Autor do badania poziomu białka IL-18 zdecydował się na analizę Western blot a do poziomu IL-1β wybrał test ELISA (zadanie 2);

- dlaczego w zadaniu badawczym 4 Doktorant wykluczył analizy poziomu białka;

- czy w swoich badaniach Doktorant rozważał pobierania krwi od badanych zwierząt? Analizując stężenie np. hormonów steroidowych, leptyny czy innych czynników prozapalnych IL-1β czy IL-8

i wykonując testy korelacji z obserwowanymi danymi z jajnika/wątroby mógłby uzyskać wiele ciekawych wyników badań niezbędnych do dyskusji pracy.

- czy w prowadzeniu hodowli myszy transgenicznych *ob/ob* i *db/db* obserwował brak owulacji, dysregulację cyklu estralnego czy obniżoną płodność? W której fazie cyklu estralnego pobierano komórki warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego do analizy transkryptomicznej od myszy kontrolnych heterozygotycznych?

Wyniki doświadczeń zostały bardzo bogato zilustrowane. Przedstawiono je na 21 rycinach skomponowanych z wykresów, zdjęć mikrofotografii oraz membran po wizualizacji i są one też dobrze i prawidłowo opisane. Należy podkreślić, że cała dokumentacja wyników rozprawy doktorskiej Pana mgr Marka Adamowskiego jest na doskonałym poziomie, co potwierdza staranne przeprowadzenie wszystkich eksperymentów i szczegółową ich analizę. Moja uwaga w tej części rozprawy doktorskiej dotyczy przedstawienia wyników badań zadania 2 i 5. Czy Doktorant rozważał rozdzielić to zadanie badawcze i wykresy, najpierw przedstawiając wpływ samej diety (CD & HFD) a potem dopiero udział leptyny (*db/db*, *ob/ob*, 16K, 16 L) na poziom mRNA i białka szlaku inflamasomu NLRP3 w jajniku i wątrobie myszy. Myślę, że wykresy z analizy Western blot byłyby bardziej przejrzyste a dyskusja porównująca zmiany poziomu inflamasomu NLRP3 w rozwoju otyłości między jajnikiem a wątrobą niezwykle interesująca. Dlaczego w wynikach zadania 5 (str. 95) Autor usunął z układu eksperymentalnego badanie stężenia białka IL-1β w wątrobie myszy *db/db*, *ob/ob* i hyperleptynemią?

Rozdział Omówienie Wyników i Dyskusja liczy 7 stron i stanowi logiczną całość. Wyróżnić w nim można pięć podrozdziałów omawiających uzyskane w ramach zadań badawczych wyniki w świetle istniejących danych literaturowych. W mojej opinii ten rozdział w porównaniu z obszernym 25 stronicowym Wstępem jest za krótki, stąd proporcja tekstu w rozdziałach pracy jest nieco zaburzona. Poza tym potencjał wyników otrzymanych w ramach pracy doktorskiej nie do końca został przedyskutowany. Moje krytyczne uwagi dotyczą podrozdziału 5.1, w którym Doktorant opisuje ekspresję szlaku inflamasomu NLRP3 w jajniku w fazie estrus i diestrus:

- brak dyskusji wyników pomiędzy podwyższonym poziomem mRNA *Casp1* a obniżoną ekspresją białka CASP1 p45 w jajnikach pochodzących z fazy diestrus;

- brak dyskusji ciekawych wyników badań immunolokalizacji NLRP3 w komórkach ciałka żółtego;

- szkoda też, że Doktorant nie przedyskutował obserwowanych różnic pomiędzy fazą estrus i diestrus. Proszę o informację/pomysł dyskusji jakie czynniki mogą decydować o zależnej od fazy cyklu estralnego ekspresji szlaku inflamasomu NLRP3 w jajniku. Doktorant obserwował zwiększoną ekspresję szlaku inflamasomu NLRP3 w fazie diestrus, w której obserwuje się maksymalny poziom progesteronu i aktywności ciałka żółtego. Jak morfologia i funkcjonalność ciałka żółtego może wpływać na podwyższony poziom inflamasomu NLRP3? Moim zdaniem w tej części dyskusji zabrakło cytacji pracy zespołu Wang i współ., (2020), którzy wykazali aktywację inflamasomu NLRP3 w komórkach ziarnistych jajnika myszy pod wpływem regulacji hormonalnej (np. androgenów).

- zainteresowało mnie końcowe zdanie tej części podrozdziału (str. 96); proszę o rozwinięcie informacji o roli inflamasomu NLRP3 w regulacji procesów fizjologicznych w jajniku w trakcie cyklu płciowego.

W dyskusji podrozdziału 5.5 (str. 102) Autor tłumaczy brak istotnych zmian w ekspresji większości genów i białek inflamasomu NLRP3 w wątrobie myszy, którym podawano leptynę, iż zastosowana dawka leptyny lub okres jej półtrwania nie jest w stanie aktywować inflamasomu NLRP3. Czy w takim razie Doktorant sugeruje zmianę protokołu eksperymentu? Czy jednak efekt działania leptyny może być zależny od badanej struktury? Myślę, że tą część dyskusji można było ją wzbogacić

o wyniki opublikowanych już badań ekspresji i roli leptyny w komórkach wątroby (np. Martínez-Uña i współ., 2020, Rodríguez i współ., 2015).

Ostatnią część rozprawy doktorskiej Pana mgr Marka Adamowskiego stanowi rozdział Podsumowanie i Wnioski, które zostały sformułowane w sposób jasny i logiczny. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorant wnioskuje, iż:

- inflamasom NLRP3 wykazuje zróżnicowaną ekspresję w jajniku myszy w trakcie cyklu płciowego;

- szlak sygnałowy leptyny reguluje aktywność inflamasomu NLRP3 w jajniku myszy we wczesnej otyłości;

- leptynoporność w późnej fazie otyłości prowadzi do obniżenia aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku myszy a zaburzenia szlaku sygnałowego leptyny przyczyniają się do zmiany ekspresji genów kluczowych dla rozwoju pęcherzyków jajnikowych;

- leptyna zwiększa ekspresję genów inflamasomu NLRP3 w komórkach wzgórka jajonośnego myszy którym podawano leptynę;

- inflamasom NLRP3 jest wcześniej aktywowany w jajnikach myszy w porównaniu do wątroby podczas rozwoju otyłości.

Bardzo podobały mi się sugestie Doktoranta odnoszące się do praktycznego zastosowania uzyskanych wyników np. możliwości wykorzystania uzyskanej wiedzy w technikach wspomaganego rozrodu ludzi i zwierząt. I stąd moje pytanie, gdyby Pan uzyskał wysokobudżetowy projekt naukowy, to jaki problem badawczy byłby przedmiotem badań w najbliższej przyszłości i dlaczego?

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Marka Adamowskiego jest wartościowym, oryginalnym dziełem naukowym, zawierającym nowatorskie wyniki, które poszerzają wiedzę z zakresu regulacji mechanizmu funkcjonowania komórek jajnika podczas otyłości. Doktorant po raz pierwszy zbadał oddziaływanie pomiędzy szlakiem sygnałowym leptyny a regulacją aktywności inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy, która jest odmienna niż w wątrobie. Autor wykazał się doskonałymi umiejętnościami w planowaniu i prowadzeniu badań, wnioskowaniu w oparciu o uzyskane wyniki oraz dużą wiedzą pozwalającą na rzeczową dyskusję. Przeprowadzone badania wymagały znakomitego przygotowania merytorycznego i warsztatowego. Opublikowana praca, a także opracowanie, będące podstawą rozprawy doktorskiej, zostały bardzo dobrze przemyślane, rzetelnie zrealizowane i starannie przygotowane. Zawarte w niniejszej recenzji uwagi, pytania czy komentarze nie umniejszają wartości merytorycznej wysoko ocenianej pracy doktorskiej lecz są zachętą do naukowej dyskusji.

Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że oceniona pozytywnie dysertacja Pana mgr Marka Adamowskiego w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim i spełnia warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz.1789) stawianym kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora.

W związku z powyższym przekładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pana mgr Marka Adamskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w *dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria*.

Z poważaniem



Kraków, 25 sierpnia 2023 roku

dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ