Warszawa, 7 września 2024 r.

Prof. dr hab. inż. Andrzej Herman

Zakład Inżynierii Genetycznej
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Instytucka 3
05-110 Jabłonna

Recenzja pracy doktorskiej mgr. Grzegorza Tomasza Kopija pt. „Wpływ wisfatyny na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutealnych świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie implantacji

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Niny Magdaleny Smolińskiej.

Jednym z ważnych czynników determinujących płodność zarówno u zwierząt, jak i u ludzi jest sposób żywienia oraz stan odżywienia organizmu. Wskazuje to na istnienie ścisłych powiązań pomiędzy procesami metabolicznymi i rozrodczymi. Dawniej tkanka tłuszczowa była uważana przede wszystkim za magazyn energii gromadzący tłuszcz pod postacią trójglicerydów, który jest uruchamiany podczas zwiększonego zapotrzebowania energetycznego organizmu. Obecnie wiadomo, że tkanka tłuszczowa jest także największym organem endokrynnym wydzielającym liczne mediatory zwane adipokinami, które w sposób auto-, para- i edokrynny mogą oddziaływać na tkanki i narządy. Uwalniane przez tkankę tłuszczową adipokiny mogą regulować liczne procesy fizjologiczne, w tym rozród u samic. Mediatory te, mogą wpływać na proces rozrodu na poziomie ośrodkowego układu nerwowego, gdyż wiele z nich przekracza barierę krew-mózg i oddziałuje na aktywność sekwencyjną układu podwzgórzowo-przysadkowego. Obecność licznych adipokin i ich receptorów stwierdzono także w obrębie układu rozrodczego samic różnych gatunków, gdzie wykazano ich wpływ m.in. na steroidogenezę jajnikową, proces dojrzewanie oocytów, implantację i rozwój zarodka. Jednakże dokładne mechanizmy, poprzez które adipokiny wpływają na funkcje jajnika są

obecnie przedmiotem intensywnych badań. Tematyka przedłożonej do oceny pracy doktorskiej mgr. Grzegorza Tomasza Kopija wpisuje się w nurt badań prowadzonych w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt przez Promotora prof. dr hab. Ninę Magdalenę Smolińską dotyczących m.in. roli adipokin w modulacji aktywności wydzielniczej osi podwzgórze-przysadka-jajniki, oraz w regulacji procesów zachodzących w macicy świni domowej. Należy podkreślić, że zaburzenia sekrecji adipokin występują u osób cierpiących na nadwagę i otyłość, schorzeń uznawanych za jeden z głównych globalnych problemów zdrowotnych. Nadwaga, a w szczególności otyłość, mogą w sposób negatywny wpływać na płodność u kobiet m.in. poprzez upośledzenie rozwoju pęcherzyków jajnikowych, powodowanie jakościowych i ilościowych wad dojrzewania oocytów oraz zaburzanie receptywności endometrium, dlatego też poznanie mechanizmów stojących u podstaw tych zaburzeń jest niezwykle ważne z punktu widzenia medycyny.

Badania opisane w obu publikacjach wchodzących w skład pracy doktorskiej mgr. Grzegorza Tomasza Kopija zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych w ramach projektu OPUS 16 nr 2018/31/B/NZ9/00781 pt. „Wisfatyna nowym regulatorem rozrodu świń: ekspresja i rola w kontroli osi podwzgórze-przysadka-jajniki w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży", którego kierownikiem była promotor pracy doktorskiej prof. dr hab. Nina Magdalena Smolińskiej.

CHARAKTERYSTYKA PRACY

Przedłożona do oceny praca doktorska liczy 39 stron i **została napisana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami dla rozpraw naukowych**. Zawiera stronę tytułową, spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp, hipotezę badawczą, cel i zakres badań, materiały i metody, wyniki, podsumowanie i wnioski oraz spis piśmiennictwa. Zestawienie cytowanych prac obejmuje 57 pozycji literaturowych. Do pracy doktorskiej dołączono dwie kopie publikacji naukowych oraz oświadczenia współautorów prac.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w 2024 roku w dwóch czasopismach indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports*®:

1. **Kopij G**, Kiezun M, Dobrzyn K, Zaobidna E, Zarzecka B, Rak A, Kaminski T, Kaminska B, Smolinska N. Visfatin affects the transcriptome of porcine luteal cells during early pregnancy. *International Journal of Molecular Science*. 2024; 25(4):2339. doi: 10.3390/ijms25042339.

IF_{2023} = 4,9; pkt MNiSW = 140

2. **Kopij G**, Kiezun M, Gudelska M, Dobrzyn K, Zarzecka B, Rytelewska E, Zaobidna E, Swiderska B, Malinowska A, Rak A, Kaminski T, Smolinska N. Visfatin impact on the proteome of porcine luteal cells during implantation *Scientific Reports*. 2024; 14(1):14625. doi: 10.1038/s41598-024-65577-1

   IF_{2023} = 3,8; pkt MNiSW = 140

Obie prace opublikowano w wysoko punktowanych czasopismach, gdyż zgodnie z obowiązującym Komunikatem Ministra Edukacji i Nauki *w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych* z dnia 05.01.2024 przyznano im 140 pkt. Sumaryczny IF obu prac należy również uznać za wysoki (dla roku 2024 przyjęto wartość IF opublikowaną przez *Web of Science* dla roku 2023), gdyż wynosi 8,7. Należy wspomnieć, że wartości te różnią się od tych wskazanych przez mgr. Grzegorza Tomasza Kopija, co wynika prawdopodobnie z czasu opracowywania pracy doktorskiej, jeszcze przed opublikowaniem w czerwcu 2024 roku nowego zestawienia przez *Journal Citation Reports*®. Publikacje wchodzące w skład ocenianej pracy doktorskiej są wieloautorskie. Pierwsza z prac ma dziewięciu, a druga aż dwunastu współautorów. Jednakże, w każdej z nich Kandydat jest pierwszym autorem, co w opinii recenzenta świadczy o ważnej roli, jaką odegrał w ich powstaniu. Na wiodącą rolę Doktoranta w powstanie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wskazują, zarówno dołączone do ocenianej rozprawy doktorskiej oświadczenia pozostałych współautorów, jak również deklaracje dotyczące udziału poszczególnych współautorów zamieszczone bezpośrednio w opublikowanych pracach. Doktorant brał udział, między innymi w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, przeprowadzeniu badań, walidacji wyników; przygotowaniu obu manuskryptów i korespondencji z recenzentami w trakcie procesu publikacyjnego. Stosunkowo duża liczba współautorów obu publikacji wydaje się być w pełni uzasadniona szerokim zakresem przedstawionych w obu pracach badań, a ich realizacja wymagała zaangażowania specjalistów z różnych dziedzin. W związku z powyższym **udział mgr. Grzegorza Tomasza Kopija w powstaniu obu prac wchodzących w skład pracy doktorskiej oceniam jako wysoki**.

OCENA MERYTORYCZNA PRACY

Należy zaznaczyć, że oceniana rozprawa doktorska mgr. Grzegorza Tomasza Kopija powstała na podstawie dwóch prac naukowych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym indeksowanych w renomowanych bazach naukowych. Fakt, że obie prace

przeszły pomyślnie pełny proces recenzencki świadczy o wysokiej wartości naukowej opisanych w nich badań i ułatwia recenzentowi ocenę merytoryczną tych prac.

W krótkim ***Wstępie,*** będącym dobrze przemyślanym i syntetycznym przeglądem literatury związanej z tematyką pracy doktorskiej, Kandydat opisuje procesy związane z matczynym rozpoznaniem ciąży, oraz wspomina o wielokierunkowych oddziaływaniach pomiędzy macicą, zarodkiem i jajnikami, w które zaangażowane są liczne mediatory. Wspomina w szczególności o roli, jaką w implantacji zarodka oraz podtrzymaniu ciąży odgrywa produkowany przez ciałko żółte (CL) progesteron (P_4), a także o znaczeniu estradiolu -17β (E_2) i estronu dla podtrzymania funkcji CL. Zarówno P_4, jak i estrogeny są istotnymi modulatorami syntezy i wydzielania prostaglandyn (PGF) zaangażowanych w regulację funkcji układu rozrodczego. Dlatego, sporą części ***Wstępu*** mgr Grzegorz Tomasz Kopij poświęca roli eikozanoidów, w szczególności PGE_2 i $PGF_{2\alpha}$ w regulacji funkcji ciałka żółtego, macicy, a także dla implantacji i rozwoju zarodka. Następnie, krótko charakteryzuje fizjologiczną rolę tkanki tłuszczowej, ze szczególnym uwzględnieniem jej funkcji wydzielniczych i zwraca uwagę na związek pomiędzy otyłością i zaburzeniami procesów rozrodczych. Kolejna część wstępu jest poświęcona wisfatynie, opisowi zarówno budowy tego białka, jak również jej plejotropowego oddziaływania w organizmie. Warto podkreślić, że opisując działanie wisfatyny Doktorant przytacza wcześniejsze doniesienia literaturowe, które wskazywały na zaangażowanie tej adipokiny w modulację rozrodu samic, co uzasadnia podjęcie badań będących podstawą ocenianej pracy doktorskiej. Kandydat podkreśla, że brakuje danych literaturowych dotyczących mechanizmów, poprzez które wisfatyna oddziałuje na procesy zachodzące w jajnikach oraz związane z implantacją zarodka w macicy.

Wstęp pracy doktorskiej jest napisany w sposób zwięzły, cytowane pozycje literaturowe zostały dobrane odpowiednio do poruszanych zagadnień. W zdecydowanej większości cytowane są prace opublikowane w ostatnich kilkunastu latach, co sugeruje, że Doktorant posiada dobrą znajomość najnowszej literatury naukowej z zakresu tematycznego związanego z prowadzonymi przez niego badaniami. Należy podkreślić, że sposób sformułowania *Wstępu* wyraźnie wskazuje na zasadność podjęcia badań opisanych w ocenianej pracy doktorskiej. To brak danych dotyczących roli wisfatyny w regulacji czynności jajników w czasie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży skłonił Kandydata do podjęcia badań dotyczących wpływu tego hormonu na globalną ekspresję genów i białek w komórkach lutealnych jajnika świni.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym ***Hipoteza badawcza, cele i zakres badań,*** **Doktorant poprawnie formułuje hipotezę badawczą** zakładającą, że wisfatyna wpływa na transkryptom i proteom komórek lutealnych świni domowej i może regulować wytwarzanie wielu czynników kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania jajników w okresie implantacji. W dalszej części rozdziału, Kandydat krótko charakteryzuje cele i zakres przeprowadzonych przez siebie badań, wspomina również o zastosowanych technikach badawczych i metodach. Chociaż rozdział ten, jest napisany klarownie, to w mojej opinii niepotrzebnie po raz kolejny hipoteza badawcza została poprzedzona krótkim uzasadnieniem podjęcia badań, gdyż problematyka ta, została poruszona i odpowiednio rozwinięta w poprzednim rozdziale. Z obowiązku recenzenta muszę również wspomnieć, że hipoteza zapisana j w tym rozdziale pracy zawiera błąd składniowy. Nie do końca jest dla mnie również jasne, dlaczego Doktorant zdecydował się na częściowo różne brzmienie hipotez badawczych zapisanych w ***Streszczeniu*** i omawianym rozdziale.

W rozdziale pracy doktorskiej pt. ***Materiały i Metody***, Kandydat opisuje sposób pozyskania materiału biologicznego – jajników od pięciu 7-8 miesięcznych loszek oraz procedury dotyczące izolacji i hodowli *in vitro* komórek lutealnych świni. Szczegółowo opisuje kolejne etapy analiz mających na celu określenie wpływu wisfatyny na profil transkrypomiczny i proteomiczny komórek lutealnych. Sposób opisu metodyki wskazuje, że Doktorant ma szeroką wiedzę dotyczącą stosowanych najnowszych technik badawczych m.in. PCR, sekwencjonowania nowej generacji, Western Blot oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, a także w użyciu zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych i oprogramowania statystycznego. Należy stwierdzić, że **zastosowane metody badawcze oraz użyte narzędzia informatyczne są adekwatne dla weryfikacji przyjętej hipotezy badawczej**. Liczba zastosowanych technik analitycznych oraz stopień zaawansowania badań mgr. Grzegorza Tomasza Kopija robią bardzo pozytywne wrażenie i wskazują na dużą samodzielność Kandydata w prowadzeniu badań. Ponadto, lektura tej części pracy potwierdza zasadność wsparcia Doktoranta ze strony innych badaczy w wykonaniu zaplanowanych doświadczeń, co docelowo przekłada się na stosunkową liczną grupę współautorów publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej. W tej części pracy, pojawiają się drobne usterki edycyjne np. w podrozdziale *3.3.2. Konstruowanie bibliotek, sekwencjonowanie RNA i kontrola jakości odczytów* cytacje są zapisane w konwencji odmiennej od przyjętej w innych częściach pracy, w zapisie niektórych liczb zastosowano kropkę jako separator dziesiętny (błąd ten pojawia się również w innych częściach pracy

doktorskiej). Chociaż w przypadku pracy naukowej użycie wyrazów zapożyczonych z języka angielskiego nie razi, to jednak sugerowałbym zastąpienie słowa „koncentracja", polskim odpowiednikiem „stężenie". Oczywiście wspomniane powyżej drobne usterki w żaden sposób nie wpływają na bardzo pozytywny odbiór tej części pracy.

Jednak, w tym momencie warto zapytać Doktoranta, dlaczego w przeprowadzonych doświadczeniach *in vitro* na komórkach lutealnych świni zdecydował o użyciu ludzkiej rekombinowanej wisfatyny? Chociaż homologia w zakresie struktury pierwszorzędowej białka wisfatyny człowieka i świni jest rzeczywiście wysoka, to czasem nawet stosunkowo niewielkie zmiany w strukturze pierwszorzędowej białek mogą znacząco wpłynąć na jego strukturę II i III rzędową i powodować, że bardzo zbliżone pod względem struktury I rzędowej białka wykazują istotne różnice konformacji, co z kolei jest nie bez znaczenia dla ich aktywności biologicznej. Dlatego też, badanie wpływu ludzkich ligandów białkowych na komórki zwierzęce może wiązać się z pewnym ryzykiem, że na uzyskane wyniki ma również wpływ pochodzenie badanych czynników.

W kolejnym rozdziale pt. ***Wyniki*** Doktorant w obszerny, dobrze usystematyzowany sposób opisuje najważniejsze wyniki odwołując się do źródłowych publikacji wchodzących w skład ocenianej pracy doktorskiej. Liczba uzyskanych wyników, podobnie jak wcześniej wspomniana liczba zastosowanych technik badawczych robią duże wrażenie. Stwierdzono m.in., że wisfatyna wpłynęła na zmianę profilu ekspresji 170 genów, wśród których 71 wykazywało obniżoną, a 99 podwyższoną ekspresję pod wpływem czynnika doświadczalnego. Z kolei przeprowadzona analiza funkcjonalna pozwoliła na przypisanie 135 z nich do 45 procesów zaliczanych do trzech głównych kategorii: „komponenty komórkowe", „funkcje molekularne" i „procesy biologiczne". Wykazano również, że wisfatyna wpłynęła na zmianę ekspresji 40 lncRNAs, w tym jedynie 3 transkrypty zidentyfikowano jako „znane". Ponadto 168 transkryptów wykazujących alternatywne warianty składania pod wpływem wisfatyny. Wisfatyna spowodowała również zmianę profilu ekspresji 511 białek, w tym 276 białek wykazywało obniżoną, a 235 białek podwyższoną ekspresję. Białka te przyporządkowano do 162 adnotacji funkcjonalnych zgrupowanych, podobnie jak w przypadku analiz transkryptomu, w trzech kategoriach: „procesy biologiczne", komponenty komórkowe" oraz „funkcje molekularne". Znacząca liczba transkryptów i białek, których ekspresja jest modulowana przez wisfatynę potwierdza wcześniejsze doniesienia o jej szerokim i plejotropowym działaniu.

W kolejnej części pracy pt. ***Podsumowanie i Wnioski*** *mgr* Grzegorz Tomasz Kopij krótko podsumowuje uzyskane wyniki i słusznie wskazuje na duży potencjał

wysokoprzepustowych metod do prowadzenia zaawansowanych badań fizjologicznych. **Doktorant poprawnie formułuje również dwa ogólne wnioski:**

1. wisfatyna wpływa na ekspresję genów zaangażowanych w procesy istotne dla funkcjonowania komórek lutealnych, takich jak.: regulacja cyklu komórkowego, migracja, proliferacja i adhezja komórek, oraz na ekspresję białek związanych z procesami proliferacji komórek jajników, różnicowania, angio- i waskulogenezy i apoptozy, pełni istotną rolę w rozwoju jajników oraz funkcjonowaniu tego gruczołu w czasie wczesnej ciąży;
2. adipokina ta, wpływa na ekspresję białek związanych z syntezą hormonów stroidowych, a także białek regulujących procesy lipogenezy oraz cholesterologenezy, co wskazuje na udział wisfatyny w regulacji procesu steroidogenezy oraz prawidłowego funkcjonowania jajników.

W ostatnim akapicie Kandydat podkreśla znaczenie przeprowadzonych badań i uzyskanych danych dla rozwoju wiedzy dotyczących fizjologii rozrodu ssaków, w szczególności w zakresie roli jaką odgrywają adipokiny w regulacji funkcji układu rozrodczego. Wskazuje również, na potencjał terapeutyczny wisfatyny, która być może mogłaby zostać wykorzystana w leczeniu zaburzeń rozrodu. Ponieważ wykonane badania zostały przeprowadzone w modelu *in vitro*, uważam, że należałoby wspomnieć o ograniczeniach wynikających z użytego modelu. Odpowiedź komórek w warunkach *in vitro* może czasem odbiegać od tej obserwowanej w warunkach *in vivo*, dlatego w tej części tekstu powinno się znaleźć jasne wskazanie na ograniczenia własnych badań i wykazanie konieczności przeprowadzenia kolejnego ich etapu na modelu zwierzęcym.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Grzegorza Tomasza Kopija pt. „Wpływ wisfatyny na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutealnych świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie implantacji" jest zwartym opracowaniem przygotowanym w oparciu o dwie monotematyczne, wzajemnie uzupełniające się publikacje stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Użycie nowoczesnych i przemyślanych rozwiązań metodycznych pozwoliło Kandydatowi osiągnąć postawione cele badawcze i zweryfikować pozytywnie postawioną hipotezę badawczą. W mojej opinii wykonanie tak ambitnych i trudnych badań wymagało dobrego przygotowania teoretycznego, specjalistycznego sprzętu, dużych umiejętności manualnych oraz analitycznych, a także dobrej znajomości narzędzi bioinformatycznych. Uważam, że przeprowadzone przez Doktoranta

badania mają istotne znaczenie poznawcze i służą rozwojowi wiedzy z zakresu nauk biologicznych, w szczególności fizjologii rozrodu. Poznanie mechanizmów poprzez które wisfatyna i inne adipokiny wpływają na procesy zachodzące w jajniku ssaków, w tym w komórkach lutealnych, przyczyniają się do rozwoju badań w dyscyplinie biologia, a nawet w dyscyplinach pokrewnych. Przeprowadzone przez mgr. Grzegorza Tomasza Kopija badania mają zauważalny potencjał praktyczny, gdyż w dalszej perspektywie mogą przyczynić się do opracowania nowych, skuteczniejszych terapii zaburzeń rozrodu.

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że praca doktorska mgr. Grzegorza Tomasza Kopija pt. „Wpływ wisfatyny na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutealnych świni domowej (Sus scrofa domestica L.) odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2023.742 ze zm.). Dlatego, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę sposób i formę przygotowania rozprawy, jej nowatorski i twórczy charakter, dużą wartość merytoryczną uzyskanych wyników, niezaprzeczalny wkład w rozwój badań z zakresu fizjologii rozrodu oraz znaczenie dla rozwoju nauki, wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

A Herman