ZAKŁAD HIGIENY, EPIDEMIOLOGII I ZABURZEŃ METABOLICZNYCH
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2c
tel/fax.85 748-55-60
e-mail: higienametz@umb.edu.pl

Białystok, 26.08.2024

Prof. dr hab. Agnieszka Błachnio-Zabielska
Zakład Higieny, Epidemiologii i Zaburzeń Metabolicznych
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Tomasza Kopij pt. „Wpływ wisfatyny na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutealnych świni domowej (Sus scrofa domestica L.) w okresie implantacji"

napisanej pod kierunkiem

prof. dr hab. Niny Magdaleny Smolińskiej

UWAGI WSTĘPNE

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pt. „Wpływ wisfatyny na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutealnych świni domowej (Sus scrofa domestica L.) w okresie implantacji", została przygotowana przez mgr Grzegorza Tomasza Kopija pod opieką naukową prof. dr hab. Niny Magdaleny Smolińskiej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt, Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Oceniana praca doktorska składa się z dwóch oryginalnych prac, opublikowanych w 2024r:

1) Visfatin Affects the Transcriptome of Porcine Luteal Cells during Early Pregnancy. International Journal of Molecular Sciences, 25(4): 2339, doi.org/10.3390/ijms25042339

IF=5.6; MEiN=140

2) Visfatin impact on the proteome of porcine luteal cells during implantation. Scientific Reports, 14, 14625, doi.org/10.1038/s41598-024-65577-1

IF=4.6; MEiN=140

Obie prace opublikowano w bardzo dobrych czasopismach z listy Journal Citation Reports i każda z nich została pozytywnie oceniona przez zespół ekspertów w danej dziedzinie. Łączny wskaźnik IF prac (w chwili składania pracy doktorskiej) wynosił 10,2 a liczba punktów MEiN wynosiła 280.

W obu publikacjach mgr Kopij jest pierwszym autorem, co świadczy o dominującej roli Doktoranta w ich powstawaniu. Ponadto, do obu publikacji dołączone zostały oświadczenia Doktoranta i współautorów, co potwierdza wiodącą rolę Doktoranta w przeprowadzeniu badań i przygotowaniu publikacji. Nie znalazłam jednak informacji o procentowym udziale Doktoranta w każdej publikacji. W obu publikacjach, promotor, prof. Nina Smolińska jest autorem korespondencyjnym.

Obie publikacje, stanowiące zasadniczą część rozprawy, poprzedza starannie przygotowane, 46-stronicowe opracowanie, obejmujące wszystkie elementy rozprawy doktorskiej: streszczenie w języku polskim i angielskim, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp, hipoteza badawcza, cele i zakres badań, opis materiału i metod badawczych, opis uzyskanych wyników, podsumowanie i wnioski, piśmiennictwo oraz oświadczenia Doktoranta i współautorów o udziale w powstawaniu prac. Piśmiennictwo, zarówno w opracowaniu polskojęzycznym jak i w obu publikacjach jest aktualne i dobrane prawidłowo. Należy podkreślić, że przeprowadzone badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w postaci grantu uzyskanego w ramach konkursu Opus 16.

Oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim.

OCENA MERYTORYCZNA

Tkanka tłuszczowa pełni funkcję izolacyjną, amortyzacyjną, ale przede wszystkim, stanowi rezerwę energetyczną, w postaci gromadzonych w adipocytach triacyloglicerolі, które w sytuacji zwiększonego zapotrzebowania energetycznego, są hydrolizowane i uwalniają kwasy tłuszczowe, które mogą być wykorzystywane, jako alternatywne do glukozy, źródło energii. Jednakże poza funkcją magazynowania energii, tkanka tłuszczowa pełni ważną funkcję endokrynną, syntetyzując i wydzielając aktywne biologicznie związki, głównie adipokiny i cytokiny prozapalne, które wpływają na regulację metabolizmu. W sytuacjach niedoboru lub nadmiaru tkanki tłuszczowej dochodzi do dysregulacji wydzielanych przez tkankę tłuszczową adipocytokin, co związane jest z obserwowanymi w takich sytuacjach zaburzeniami, w tym zaburzeń funkcji rozrodczych. Od ponad dwudziestu lat, w związku ze wzrastającą na świecie liczbą osób z nadwagą i otyłością, prowadzone są intensywne badania dotyczące wydzielanych przez tkankę tłuszczową aktywnych biologicznie związków. Tkanka tłuszczowa podskórna i trzewna różnią się nie tylko aktywnością metaboliczną, ale również profilem wydzielanych adipocytokin. Na rozwój badań nad endokrynną funkcją tkanki tłuszczowej ogromny wpływ miały badania amerykańskiego genetyka Jeffrey'a M. Friedmana, które doprowadziły do odkrycia leptyny. Liczba znanych bioaktywnych cząsteczek wydzielanych przez tkankę tłuszczową systematycznie wzrasta. Wisfatyna, to peptyd odkryty w 2005 r., lecz mimo intensywnych badań, jej rola nie została w pełni poznana. Dotychczasowe badania dotyczące roli wisfatyny skupiały się głównie na jej wpływie na metabolizm glukozy, lipidów i regulacji procesów zapalnych. Niewiele wiadomo na temat wpływu tej adipokiny na układ rozrodczy, a dostępne nieliczne dane wskazują, że może pełnić istotną rolę w regulacji procesów rozrodczych u samic. W związku z tym, podjęte przez Doktoranta badania są w pełni uzasadnione, a uzyskane wyniki stanowią ważną składową nowej wiedzy na temat tego peptydu.

Uważam, że podjęty przez Doktoranta temat jest bardzo ciekawy, ważny i aktualny, ze względu na brak w literaturze danych dotyczących roli wisfatyny w regulacji procesów rozrodczych, a w szczególności w regulacji czynności jajników w czasie cyklu rujowego i ciąży. O wadze podjętych przez Doktoranta badań świadczy uzyskanie finansowania na ich przeprowadzenie w ramach grantu z NCN.

Tytuł rozprawy doktorskiej jest trafny i odzwierciedla jej treść. Polskojęzyczne opracowanie poprzedzające dołączone publikacje, rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim. Streszczenia stanowią syntetyczny i zwięzły opis hipotezy, celu przeprowadzonych badań,

sposobu ich przeprowadzenia, uzyskane wyniki oraz wnioski z nich wypływające. Następną częścią rozprawy jest Spis publikacji składających się na rozprawę doktorską. Następne 4 strony, to zwięzły Wstęp, który stanowi doskonałe wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej, oraz przedstawia przesłanki uzasadniające podjęcie przeprowadzonych badań. Wstęp kończy jasno sformułowany cel pracy. Celem pracy było określenie wpływu wisfatyny na profil transkryptomiczny i proteomiczny komórek lutealnych świni w 15-16 dniu ciąży. Następny rozdział rozprawy zatytułowany został jako: Hipoteza badawcza, cele i zakres badań. Tytuł tego rozdziału jest nieco mylący, gdyż w tym rozdziale ujęta została hipoteza i zakres badań, natomiast brak jest wyszczególnionych celów badawczych. Cel badania, jak wcześniej wspominałam, został zawarty w rozdziale Wstęp. Sformułowana przez Doktoranta hipoteza zakładała, 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 celu weryfikacji postawionej hipotezy, Doktorant założył przeprowadzenie wielkoskalowych analiz transkryptomicznych i proteomicznych komórek lutealnych świni poddanych działaniu wisfatyny.

Część pracy dotycząca materiału i metodologii badań, wyczerpująco opisuje przebieg prowadzonych badań oraz wykorzystane metody badawcze. Wszystkie metody zostały dość szczegółowo opisane w dołączonych publikacjach. Badania w obu pracach zostały przeprowadzone na komórkach lutealnych, pobranych od świń w 15-16 dniu ciąży. W pracy nr 1., opublikowanej w International Journal of Molecular Sciences, przeprowadzono analizę poziomu ekspresji genów, zdarzeń alternatywnego składania transkryptów oraz profilu ekspresji długich niekodujących RNA z użyciem metody Sekwencjonowania Następnej Generacji (NGS, RNA-Seq), natomiast w pracy nr. 2, opublikowanej w Scientific Reports, przeprowadzono wielkoskalową analizę proteomiczną przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas. Warto podkreślić, że w badaniach zastosowano bardzo nowoczesne i wymagające specjalistycznej wiedzy i umiejętności metody, takie jak Sekwencjonowanie Następnej Generacji czy spektrometria mas zastosowana do przeprowadzenia wielkoskalowej analizy proteomicznej. Uważam, że część badawcza pracy doktorskiej została przeprowadzona prawidłowo z zachowaniem należytej staranności. Niemniej jednak Doktorant nie ustrzegł się pewnych niedociągnięć w opisie zastosowanych metod. Istnieje rozbieżność pomiędzy opracowaniem polskojęzycznym a publikacją, dotyczące metodyki opisującej walidację wybranych genów oraz długich niekodujących RNA o zmienionej pod wpływem wisfatyny ekspresji, metodą qPCR

(podrozdział 3.3.6). W opracowaniu polskojęzycznym Doktorant napisał, że matrycę do reakcji stanowiło RNA. W publikacji natomiast jest zawarta informacja, że RNA zostało najpierw przepisane na cDNA. Szkoda też, że doktorant nie dołączył do doktoratu materiałów z suplementu towarzyszącego publikacji nr. 1, tym bardziej, że w opracowaniu polskojęzycznym odwołuje się do tych materiałów. Nigdzie nie znalazłam też informacji w jaki sposób ustalono liczebność zwierząt, od których zostały pobrane komórki lutealne. Ponadto, w polskojęzycznym opracowaniu podana została informacja, że jajniki zostały pobrane od pięciu zwierząt, natomiast w pracy opublikowanej w Scientific Reports widnieje informacja, że materiał do badań pobrano od czterech zwierząt.

W części opisującej sposób przeprowadzenia badań proteomicznych również występują niejasności i rozbieżności między opracowaniem polskojęzycznym a publikacją. W podrozdziale 3.4.2, opisującym trawienie białek, Doktorant napisał, że za pomocą filtra Vivacon usunięto białka o masie 30 kDa, tymczasem zgodnie z metodyką opisaną w publikacji, filtr zastosowany został w celu efektywnego proteolitycznego trawienia białek a nie do frakcjonowania względem masy molekularnej. Bardzo proszę o wyjaśnienie tej kwestii w trakcie obrony. Zaznaczyć należy jednak, że przedstawione przeze mnie uwagi wynikają raczej ze sposobu opisu metodyki w języku polskim a nie z przeprowadzenia procedur analitycznych, które zostały poprawnie opisane w oryginalnych pracach anglojęzycznych. Stąd też uwagi te nie wpływają na wysoką ocenę wartości przeprowadzonych badań.

Dzięki przeprowadzonym badaniom, Doktorant uzyskał oryginalne i cenne wyniki. Mgr Kopij wraz ze współpracownikami wykazał, że wisfatyna wpływa na zmianę ekspresji 170 genów, 40 długich niekodujących RNA oraz 168 transkryptów wykazujących alternatywne warianty składania. Ponadto, wykazał, że wisfatyna wpływa na zmianę profilu 511 białek. Opis wyników jest prawidłowy, czytelny i wyczerpujący, niemniej jednak, łatwiej byłoby podążać za opisywanymi wynikami, gdyby do opracowania polskojęzycznego dołączone były ryciny i tabele.

Analiza uzyskanych wyników, pozwoliła Doktorantowi zweryfikować postawioną hipotezę i wysunąć dwa trafne wnioski:

1. wisfatyna poprzez wpływ 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. wpływ adipokiny na ekspresję białek związanych z syntezą hormonów steroidowych, a także białek regulujących procesy lipogenezy oraz cholesterologenezy wskazuje na jej udział w regulacji procesu steroidogenezy oraz prawidłowego funkcjonowania jajników.

UWAGI I KOMENTARZE

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na kilka niedociągnięć, które mają głównie charakter techniczny i edytorski, i nie mają wpływu na wysoką ocenę merytoryczną dysertacji:

1. W opisie Metodyki dotyczącej analizy z wykorzystaniem LC/MS/MS, znajdują się niefortunne określenie wypełnienia kolumny chromatograficznej jako „kulki". W polskiej nomenklaturze raczej używa się sformułowania „ziarno".
2. Doktorant w opracowaniu polskojęzycznym wielokrotnie używa terminu „koncentracja", co jest zapewne bezpośrednim tłumaczeniem z angielskiego, nie mniej jednak w języku polskim prawidłowym określeniem jest „stężenie".
3. W polskojęzycznym opracowaniu brakuje wykazu skrótów, które w sposób znaczący ułatwiłyby analizę tekstu.
4. Doktorant często używa nazwę adipokina jako synonim do wisfatyna, co nie jest do końca poprawne, gdyż adipokiny, to grupa związków, a wisfatyna jest jednym z nich.
5. Choć praca napisana jest bardzo starannie, to Doktorant nie ustrzegł się nielicznych i drobnych błędów literowych i edytorskich, jak np. końcówka w słowie wisfatyny zamiast wisfatyna na str. 14; w rozdziale Podsumowanie i wnioski, w pierwszym zdaniu: „... w przedstawionych w pracy hipotezy..." ; w przedostatnim na tej samej stronie zdaniu, błąd w składni: „...reguluje komórek lutealnych"

Podczas obrony, chciałabym, aby Doktorant odpowiedział na pytanie:

1. W jaki sposób uzyskane przez Doktoranta wyniki mogą mieć zastosowanie praktyczne?

UWAGI KOŃCOWE

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji 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 pracą wartościową pod względem naukowym, dobrze przygotowaną warsztatowo i wnosi ważne elementy poznawcze. Oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymagania wyszczególnione w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023.742 ze zm.). Dlatego mam zaszczyt przełożyć Radzie Naukowej Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pozytywną ocenę rozprawy wraz z wnioskiem o dopuszczenie mgr Grzegorza Tomasza Kopija do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość poznawczą badań i ich nowatorski charakter, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie pracy.