

Olsztyn, 2. września 2021

dr hab. inż. Barbara Kamińska, prof. UWM
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr DOMINIKI WOLAK

pt. Metaloproteinazy w jajniku ptaków

Ocena została wykonana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Katedrze Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Anna Hrabia.

Badania zostały sfinansowane ze środków NCN (projekt NCN, UMO-2015/19/B/NZ9/01356).

Jako podstawę do ubiegania się o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora Pani magister Dominika Wolak przedłożyła rozprawę doktorską, na którą składają się trzy oryginalne publikacje w języku angielskim oraz streszczenie w języku angielskim, streszczenie (autoreferat w języku polskim), a także oświadczenia współautorów publikacji o indywidualnym wkładzie pracy. We wszystkich trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Jej indywidualny udział w powstaniu poszczególnych publikacji jest szacowany na 60-70%.

Charakterystyka bibliometryczna publikacji:

- I. Wolak D., Hrabia A. 2021. Alternations in the expression of selected matrix metalloproteinases (MMP-2, -9, -10, and -13) and their tissue inhibitors (TIMP-2 and -3) and MMP-2 and -9 activity in the chicken ovary during pause in laying induced by fasting. *Theriogenology*, 161:176-186 (IF=2,094; 140 pkt. MEiN),
- II. Wolak D., Hrabia A. 2020. Tamoxifen-induced alterations in the expression of selected matrix metalloproteinases (MMP-2, -9, -10, and -13) and their tissue

inhibitors (TIMP-2 and -3) in the chicken ovary. *Theriogenology*, 148; 208-215 (IF=2,094; 140 pkt. MEiN),

- III. Wolak D., Sechman A., Hrabia A. 2021. Effect of eCG treatment on gene expression of selected matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10, and MMP-13) and their tissue inhibitors (TIMP-2 and TIMP-3) in the chicken ovary. *Animal Reproduction Science*, 224:106666 (IF=1,66; 140 pkt. MEiN).

Opublikowanie wyników badań w czasopismach takich jak *Theriogenology* i *Animal Reproduction Science* nie jest zadaniem łatwym. Wymaga od autorów specjalistycznej wiedzy, opanowania metodyki doświadczalnej, a przede wszystkim wymaga umiejętności dyskusji naukowej oraz podjęcia dialogu z, często wieloma, recenzentami. Uzyskane w tych publikacjach: sumaryczny IF (ponad 5,8) i liczba punktów MEiN (420) dodatkowo świadczą o dojrzałości naukowej osoby starającej się o stopień doktora.

Zakres badań. Hipoteza badawcza. Wyniki.

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej stanowią spójny tematyczny ciąg badań dotyczących udziału grupy enzymów – metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i ich naturalnych, specyficznych tkankowych inhibitorów w regresji jajnika kury (*Gallus gallus domesticus*) podczas przerwy w nieśności. Przerwę wywoływano doświadczalnie: poprzez restrykcje żywieniowe (głodzenie), iniekcje modulatora receptorów estrogenowych (tamoksifenu) lub gonadotropiny kosmówkowej koni (eCG).

Jajnik jest narządem, który podlega dynamicznym zmianom strukturalnym i czynnościowym związanym z procesami wzrostu, rozwoju i dojrzewania płciowego samicy. W jajniku zachodzą również cykliczne zmiany architektury: podczas wzrostu, atrezji, selekcji i owulacji pęcherzyków, a także podczas rozwoju i degeneracji ciała żółtego (ssaki). U niektórych gatunków (np. rozmnażających się sezonowo) okresowo dochodzi do regresji jajników. Regresja tego narządu i ograniczenie nieśności w niesprzyjających warunkach środowiskowych (temperatura, długość dnia itp.) lub przy braku pokarmu jest naturalnym mechanizmem, chroniącym samicę, jej potomstwo i w konsekwencji cały gatunek. Regresję jajników u kur wywołują także niektórzy hodowcy, stosując np. restrykcje żywieniowe w celu przerwania nieśności, doprowadzenia do przepierzenia, a następnie „odmłodzenia” stada i nowego cyklu rozrodczego (produkcyjnego).

Opisanym zjawiskom przebudowy jajnika towarzyszy kompleksowa reorganizacja macierzy zewnątrzkomórkowej, związana z procesami proteolizy. W przebudowie tkanek, w tym tkanek układu rozrodczego ptaków, uczestniczy duża grupa enzymów proteolitycznych,

m.in. metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs). Wspólną cechą tych białek jest działanie zależne od kofaktorów – jonów metali (cynku i wapnia). Enzymy te wraz ze swoimi specyficznymi tkankowymi inhibitorami (TIMPs) tworzą tak zwany system MMPs.

Dane dotyczące roli systemu MMPs w regresji jajnika ptaków, a także hormonalnej regulacji tego procesu są bardzo fragmentaryczne, dlatego podjęte przez Doktorantkę badania mają charakter nowatorski, a wyniki w dużej części są pionierskie.

Hipoteza badawcza rozprawy doktorskiej zakładała, że wybrane komponenty systemu MMPs są zaangażowane w regresję jajnika ptaków, oraz że gonadotropiny (FSH) i hormony steroidowe (estrogeny) wpływają na ekspresję/aktywność składowych tego systemu.

W celu weryfikacji hipotezy w pęcherzykach jajnikowych kury zbadano:

1. zmiany ekspresji genów kodujących wybrane metaloproteinazy (MMP-2, MMP-9, MMP-10 i MMP-13) i ich inhibitory (TIMP-2 i TIMP-3) oraz zmiany w ilości, aktywności enzymatycznej i lokalizacji białek MMP-2 i MMP-9 podczas przerwy w nieśności wywołanej głodzeniem (publikacja I),
2. udział estrogenów w regulacji ekspresji genów kodujących wybrane metaloproteinazy i ich inhibitory (MMP-2, MMP-9, MMP-10 i MMP-13 oraz TIMP-2 i TIMP-3), a także ich udział w regulacji ekspresji i aktywności białek MMP-2 i MMP-9; przerwę w nieśności wywoływano tamoksifenem – modulatorem receptorów estrogenowych (publikacja II),
3. wpływ gonadotropin na ekspresję genów kodujących wybrane metaloproteinazy oraz ich inhibitory (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 i MMP-13 oraz TIMP-2 i TIMP-3) oraz ich wpływ na ekspresję i aktywność białek MMP-2 i MMP-9; przerwę w nieśności wywoływano gonadotropiną kosmówkową koni (publikacja III).

Doktorantka wykazała, że jajnik kury jest miejscem syntezy i działania wybranych elementów systemu MMPs. Badane metaloproteinazy najprawdopodobniej nie są zaangażowane w regulację zaawansowanych etapów atrezji żółtych pęcherzyków jajnikowych. Uzyskane wyniki wskazują również na udział estrogenów i gonadotropin w transkrypcji genów, ekspresji białek i aktywności enzymatycznej badanych elementów systemu MMPs.

Publikacje. Uwagi

Publikacje powyższe zostały ocenione już przez co najmniej sześciu recenzentów – specjalistów w danej dziedzinie i trzy zespoły redakcyjne (a redaktorzy bywają nawet bardziej wymagający od recenzentów). Zastosowane metody badawcze są nowoczesne, wyniki są dobrze udokumentowane i umiejętnie przedyskutowane, staranność i skrupulatność w opisie

statystycznym wyników budzi podziw (dziewięć różnych liter do opisu istotności różnic na wykresach w publikacji II). Proszę jednak o wyjaśnienie/rozważenie kilku nasuwających się kwestii:

1. Analiza real-time PCR. Tak jak nieskończone są spory filozofów, tak nieskończone są spory biologów molekularnych o wybór właściwego genu referencyjnego. Co zdecydowało o wyborze *18S rRNA*? Czy głodzenie (zabieg drastyczny) nie wpływa na ekspresję tego genu?
2. Analiza statystyczna. Jakim testem statystycznym sprawdzano czy uzyskane zmienne wykazują/lub nie rozkład normalny? W publikacjach nie podano informacji na ten temat, a z własnego doświadczenia wiem, że to czy dane wykazują rozkład normalny zależy czasami od... rodzaju testu.
3. Czy nie rozważano możliwości ujednoczonej analizy statystycznej dla wszystkich danych, niezależnie od ich rozkładu, tj. albo używania tylko testów nieparametrycznych (np. zawsze test *U*, zamiast testu *t* Studenta) lub po spełnieniu pewnych warunków, analizy wszystkich danych bardziej czułymi testami parametrycznymi (klasyczna ANOVA lub test *t* Studenta)?
4. Co zadecydowało ostatecznie o wyborze tamoksifenu jako antagonisty/blokera receptorów estrogenowych? Czy doktorantka rozważała wybór innych, może bardziej specyficznych preparatów (np. ICI 182 780)?
5. Podobne pytanie dotyczy eCG. W doświadczeniach *in vitro* podaje się FSH lub LH. Co zadecydowało o wyborze tej gonadotropiny do badań *in vivo*?

Autoreferat. Omówienie. Uwagi

Według ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Ustawa z dnia 20. lipca 2018.; Dz. U., W-wa, 30. 08. 2018 r., poz. 1668, Rozdział 2, art.187, pkt. 3 i 4) „do rozprawy dołącza się streszczenie”. Ustawodawca nie określa przy tym jak ma ono wyglądać. Streszczenie takie przybiera często objętość i formę manuskryptu (autoreferatu) tradycyjnego doktoratu, ma typowy podział na rozdziały i jest zaopatrzone swoim streszczeniem. Tak też jest w tym przypadku. Konia z rządem jednak temu, kto spróbuje zawrzeć opracowanie trzech tak obszernych publikacji w objętości mniejszej niż np. 10 stron. Oceniając streszczenie, zdaję sobie również sprawę z faktu, że autoreferat taki (manuskrypt) nie zostanie w przyszłości opublikowany. Dlatego autor nie ma już możliwości poprawy swojego tekstu np. przed wysłaniem do redakcji, może się jedynie odnieść do uwag w czasie obrony.

Streszczenie pracy doktorskiej Pani Dominiki Wolak obejmuje 55 stron, podzielonych na rozdziały (Streszczenie, Summary, Spis publikacji, Wstęp, Hipotezy badawcze, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Spis literatury). Autoreferat napisany jest poprawną polszczyzną, generalnie w sposób zrozumiały i przystępny. Szczególnie rozdział Streszczenie jest bardzo dobrą syntezą uzyskanych wyników i zakończony jest odpowiednim, zwięzłym podsumowaniem.

Wstęp bardzo dobrze wprowadza czytelnika w badany temat, pomocny jest zawarty tam szczegółowy opis jajnika ptaków i charakterystyka metaloproteinaz. Hipoteza i cele pracy sformułowane są w sposób jasny.

Materiały i metody są również skrupulatnie opisane, z wyjątkiem może zasady działania zestawu Biotrak. Opisując metody w języku polskim, czasami trudno pozbyć się anglicyzmów. Ale jest to wykonalne. O ile definicja „sonikowanie, sonikować” przyjęła się w języku polskim to jednak zamiast „worteksować” (nie istnieje jeszcze w słownikach) lepiej po prostu napisać: „energicznie wytrząsać” a strippowanie (pisane przez dwa „p”) zgrabniej jest zastąpić słowem „usunięcie, wyflukanie”.

W części „Analiza statystyczna wyników” są według mnie pewne nieścisłości. Wyników nie poddawano analizie wariancji dwuczynnikowej (przynajmniej nie zaznaczano tego w publikacjach, chociaż układ niektórych wykresów taką analizę sugeruje). Podobnie, w publikacjach nie używano testu *post-hoc* Duncana tylko Dunna (publikacja I) lub S-N-K (publikacja I, II i III). Dodatkowo, w opisie analizy precyzyjniejsze byłoby stwierdzenie, że statystycznie istotny wskaźnik różnic przyjęto dla p – nie: „na poziomie 0,05” tylko „na poziomie poniżej 0,05 ($p < 0,05$)”.

Wyniki. Ten rozdział jest najobszerniejszą częścią manuskryptu, mimo że nie prezentowano w nim rycin, tylko odwoływano się do oryginalnego tekstu publikacji (postępowanie bardzo dobre). W dziale tym, punkt po punkcie Doktorantka bardzo szczegółowo po raz kolejny omówiła swoje wyniki. Nieliczne błędy redakcyjne (kropki w liczbach zamiast przecinków, używanie najpierw skrótów Ryc. a potem Fig.) oraz czasami niezbyt precyzyjne skróty myślowe „względna transkrypcja” (s. 33) zamiast „względny poziom transkrypcji”, „nieznacznie wzrastał” przy omawianiu wzrostu statystycznie istotnego (s. 37 akapit drugi) oraz pomyłki np. „najniższą” zamiast „najwyższą” (s. 37 ostatni akapit) składam na karb obszerności tekstu i stopnia skomplikowania. Pewne uwagi mam tylko do sposobu omawiania niektórych rycin (problem ten nie występuje w oryginalnych publikacjach). Omawiając rycinę, złożoną z pięciu wykresów (prezentowanych nie zawsze po kolei) lepiej po każdym omówionym wyniku podawać, którego wykresu on dotyczy, zamiast kończyć akapit

informacją: publikacja I, Ryc. 4. B-E (s. 31). Podobnie, jeśli w danym akapicie omawiane są na zmianę dane prezentowane na wykresie z danymi nieprezentowanymi to dobrze byłoby to precyzyjnie zaznaczyć (rozdział 6.2.3). Rozdział 6.1.5. omawia bardzo interesująca rycinę 6. (publikacja I), składającą się z czterech fotografii, w ogóle nie odnosząc się do niej.

Dyskusja. Rozdział napisany w układzie klasycznym, tzn. najpierw prezentowane są uzyskane wyniki, potem dyskusja tych wyników z wynikami innych autorów i krótkie podsumowania każdego akapitu (bardzo przydatne i rzeczowe). Mimo, że Dyskusja obejmuje trzy odrębne publikacje, Doktorantka połączyła je w spójną całość. Publikacje wchodzące w skład doktoratu są wyjątkowo bogate w wyniki. Nawet podanie ich w formie skróconej spowodowało, że to one generalnie dominują w Dyskusji. Być może zamiast Dyskusji (wyniki są przecież już przedyskutowane w publikacjach) lepiej byłoby wprowadzić Podsumowanie, nawet w punktach (ustawa nie określa formy i objętości streszczenia). To tylko rozważania teoretyczne recenzenta. Zastrzeżenie mam właściwie do brzmienia jednego zdania (s. 43, akapit 2): „Ponieważ w doświadczeniu 1 obserwowano zmniejszenie stężenia estrogenów w osoczu krwi kur głodzonych, w doświadczeniu 2 ...”. W doświadczeniu 1. nie badano stężenia estrogenów, jedyna wzmianka o tym zjawisku jest dopiero w dyskusji publikacji I i są to dwie zacytowane prace innych autorów [26; 29] oraz powołanie się na własne ale niepublikowane dane.

Manuskrypt zakończony jest bardzo dobrze sformułowanymi wnioskami, odpowiednimi do uzyskanych wyników. Wnioski precyzyjnie odnoszą się do hipotez badawczych postawionych przez Panią magister Dominikę Wołak na początku badań.

Podsumowanie

Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem skomplikowanego i nowoczesnego warsztatu badawczego. Problemy badawcze i wyniki przedyskutowała ze zrozumieniem, co świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym i znajomości piśmiennictwa z zakresu prowadzonych badań. Wyniki są pionierskie i unikatowe oraz stanowią bardzo ważny punkt wyjściowy dla dalszych badań. Na podstawie analizy całości ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka opanowała wszelkie umiejętności potrzebne w dalszej pracy naukowej. Generalnie, wszystkie uwagi lub pytania przedstawione w recenzji mają charakter własnych rozważań recenzenta, lub dotyczą drobnych błędów redakcyjnych i nieścisłości. Nie umniejszają w żadnym stopniu naukowej wartości rozprawy.

Wnioski końcowe

W oparciu o Ustawę z dnia 14. marca 2003 r. *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Dominiki Wolak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, mając na uwadze wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań i ich oryginalny charakter (co również uznali recenzenci oraz redakcje, kwalifikujące te prace do druku w czasopismach o światowym zasięgu), proszę Wysoką Radzę Dyscypliny o rozważenie wniosku o wyróżnienie pracy.

Z poważaniem,

dr hab. inż. Barbara Kamińska, prof. UWM

Olsztyn, 2. września 2021

