

Prof. dr hab. Nina Smolińska  
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
10-718 Olsztyn  
Ul. Oczapowskiego 1A

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Mariami Jasaszwili  
pt. „Udział adropiny w regulacji adipogenezy oraz metabolizmu i funkcji  
endokrynych adipocytów”  
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marka Skrzypskiego, prof. UPP  
w Katedrze Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt,  
na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu**

Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo Dziekana Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 24 listopada 2021 r. informujące o powierzeniu mi obowiązków recenzenta wyżej wymienionej rozprawy doktorskiej.

#### **OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA**

Oceniana rozprawa doktorska składa się z trzech oryginalnych publikacji – niżej wyszczególnionych – opublikowanych w języku angielskim w czasopismach z listy *Journal Citation Reports*, których wskaźniki naukometryczne są wysokie: łączny wskaźnik *IF* wynosi **12,211** a liczba punktów *MEiN* wynosi **300**.

1. **Jasaszwili M**, Wojciechowicz T, Billert M, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Effects of adropin on proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells and rat primary preadipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2019; 496:110532. doi: 10.1016/j.mce.2019.110532. (**IF – 4,102; pkt. MEiN – 100**)
2. **Jasaszwili M**, Wojciechowicz T, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Adropin stimulates proliferation but suppresses differentiation in rat primary brown preadipocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2020; 692:108536. doi: 10.1016/j.abb.2020.108536. (**IF – 4,013; pkt. MEiN – 100**)



3. **Jasaszwili M**, Pruszyńska-Oszmałek E, Wojciechowicz T, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Adropin Slightly Modulates Lipolysis, Lipogenesis and Expression of Adipokines but Not Glucose Uptake in Rodent Adipocytes. *Genes (Basel)* 2021; 12(6):914. doi: 10.3390/genes12060914. (*IF* – 4,096; *pkt. MEiN* – 100)

Publikacje są współautorskie i Doktorantka jest w nich pierwszym autorem. Autorem korespondencyjnym jest Pan Promotor, dr hab. Marek Skrzypski, prof. UPP. Z przedłożonych oświadczeń współautorów wynika, że Pani mgr Mariami Jasaszwili pełniła wiodącą rolę w powstawaniu tych publikacji. Jej indywidualny udział w powstaniu poszczególnych publikacji jest szacowany na 60-65%. Zbiór publikacji stanowiących zasadniczą część rozprawy doktorskiej poprzedza obszerny (114 stron) polskojęzyczne opracowanie (autoreferat), w skład którego wchodzi: wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, spis treści, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, hipoteza badawcza i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja z podsumowaniem każdej załączonej anglojęzycznej publikacji, wnioski, podsumowanie, bibliografia (360 pozycji), spis tabel i rycin, a także oświadczenia współautorów. Należy podkreślić, że prezentowane wyniki badań uzyskano dzięki realizacji projektu badawczego, którego kierownikiem jest Pan Promotor dr hab. Marek Skrzypski, prof. UPP (SONATA Nr 2013/09/B/NZ7/00405), finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Pod względem formalnym oceniana rozprawa spełnia wszelkie wymogi stawiane tego typu opracowaniom.

### OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Tematyka badawcza ocenianej rozprawy doktorskiej dotyczy określenia roli adropiny w regulacji adipogenezy oraz metabolizmu i funkcji endokrynych adipocytów. Otyłość to jedna z wielu chorób cywilizacyjnych, która rozwija się w wyniku utrzymującego się dłuższy czas dodatniego bilansu energetycznego. Liczne badania potwierdzają, że na rozwój otyłości mają wpływ czynniki środowiskowe i genetyczne, ale także fizjologia tkanki tłuszczowej. Wśród czynników środowiskowych sprzyjających rozwojowi otyłości najczęściej wymienia się niewłaściwe nawyki żywieniowe (spożywanie łatwo przyswajalnych cukrów, wysokokalorycznej żywności) oraz siedzący tryb życia. Nadmierna ilość tkanki tłuszczowej zwiększa ryzyko występowania szeregu chorób, w tym układu krążenia, przewodu pokarmowego, układu rozrodczego, układu ruchu oraz sfery psychicznej. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), rocznie z powodu chorób związanych z nadwagą i otyłością umiera ponad 2,5 mln osób na świecie. Tkanka tłuszczowa, oprócz tego, że jest miejscem magazynowania energii, jest także narządem dokrewnym, który wydziela około 1000 białek zwanych adipokinami. Narząd ten podlega działaniu wielu czynników, w tym neuropeptydów. Jednakże pomimo wielu badań, nadal nie wiadomo, które z tych związków



mogą stanowić czynniki prognozujące rozwój otyłości i w głównej mierze zapobiegać jej rozwojowi. Ponadto, mechanizmy komórkowe prowadzące do zaburzeń czynności tkanki tłuszczowej również nie są w pełni poznane. Przedstawione przez Doktorantkę nowe wyniki w pewnym stopniu tę lukę uzupełniają. Hipoteza badawcza rozprawy doktorskiej zakładała, że adropina reguluje adipogenezę oraz metabolizm i funkcje endokrynne adipocytów. W celu weryfikacji hipotezy określono wpływ adropiny na proliferację i różnicowanie preadipocytów białej i brunatnej tkanki tłuszczowej oraz zbadano wpływ adropiny na proces lipolizy, lipogenezy, dokomórkowego transportu glukozy oraz funkcji endokrynnych białych adipocytów. Doktorantka jako model badawczy wybrała linię komórkową mysich fibroblastów 3T3-L1 oraz preadipocyty izolowane z białej i brunatnej tkanki tłuszczowej szczura. Prowadzenie badań we wspomnianym obszarze naukowym uważam za szczególnie pożądane ze względu na konieczność opracowania nowych terapii w leczeniu otyłości i chorób z nią związanych. Zatem, podjęte przez Doktorantkę badania uważam za w pełni uzasadnione, a tematykę badawczą – za interesującą i aktualną. O tym, że badania są ważne i nowatorskie może również świadczyć fakt uzyskania bardzo wysokiej ich oceny i co z tym jest związane – uzyskanie finansowania przez NCN na ich prowadzenie w ramach wymienionego wcześniej projektu.

Podstawą przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej są, jak już wcześniej wspomniałam, poprzedzone autoreferatem, trzy prace naukowe opublikowane w bardzo dobrych, prestiżowych czasopismach o międzynarodowym zasięgu, które z pewnością zostały ocenione przez zespół recenzentów oraz edytorów poszczególnych czasopism. Niemniej jednak rolą recenzenta rozprawy doktorskiej jest ich całościowa analiza. Należy podkreślić, że oceniane prace są tematycznie, ale również metodycznie, spójne i wartościowe pod względem poznawczym.

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 w języku angielskim, a do rozprawy przygotowanej w języku obcym również streszczenie w języku polskim”. Ustawodawca nie precyzuje przy tym jak ma ono wyglądać. Streszczenie takie przybiera często objętość i formę manuskryptu tradycyjnego doktoratu, ma typowy podział na rozdziały i jest zaopatrzone swoim streszczeniem. Tak też jest w tym przypadku. Zrozumiałam dla mnie fakt, iż bardzo trudno zawrzeć opracowanie trzech tak obszernych publikacji w objętości mniejszej niż np. 10 stron. Oceniając streszczenie, mam świadomość, że autoreferat 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.

*Streszczenia* w pracach oryginalnych i w polskojęzycznym opracowaniu są bardzo dobrą syntezą uzyskanych wyników i zakończone są odpowiednimi, zwięzłymi podsumowaniami. W 33-stronicowym *Wstępie* polskojęzycznego opracowania, Doktorantka w dziewięciu



podrozdziałach dokonuje szczegółowego przeglądu literatury (290 pozycji) i w przejrzysty sposób prezentuje aktualny stan wiedzy na temat zagadnień będących przedmiotem Jej badań. Doktorantka przedstawia dane dotyczące m.in. budowy i funkcji tkanki tłuszczowej oraz jej roli w patogenezie otyłości, adipogenezy, lipogenezy, lipolizy, substancji biologicznie czynnych wydzielanych przez komórki tłuszczowe i adropiny. Ogromna liczba cytowanych publikacji świadczy o bardzo dobrej znajomości tematyki podjętych badań. Pozytywnie oceniam zarówno rozdział *Wstęp* w polskojęzycznym opracowaniu jak i wstępy w pracach oryginalnych, w których Doktorantka uzasadnia wybór problemu naukowego i płynnie prowadzi do sformułowania celu badań. W mojej opinii, sformułowano go poprawnie i dodam, że został w pełni zrealizowany. We *Wstępie* polskojęzycznego opracowania pojawiły się bardzo dobre, ale tylko dwa, schematy dotyczące adipogenezy. Szkoda, że Autorka nie zamieściła dodatkowych rycin/schematów, które z pewnością ułatwiłyby i uatrakcyjniłyby analizowanie tej części rozprawy. Pragnę zwrócić uwagę, że skróty nazw genów należy pisać kursywą (np. *UCPI*). We *Wstępie* pracy znalazłam niefortunny zwrot: „podstawami leżącymi u badań omawianych w niniejszej pracy” (str. 43).

Rozdziały *Materiały i metody* w pracach oryginalnych i w autoreferacie zostały przygotowane w sposób właściwy i uporządkowany. Zawierają opisy użytych komórek, część metodyczną oraz przedstawiają sposób analizowania wyników. Bardzo pomocne są schematy przedstawiające przeprowadzone doświadczenia zamieszczone w polskojęzycznym opracowaniu. Zakres stosowanych metod jest szeroki, co wskazuje na duże umiejętności Doktorantki i bogaty warsztat eksperymentalny. Wykorzystano w niej rozmaite techniki m.in. hodowle i różnicowanie komórek 3T3-L1, izolacje, hodowle i różnicowanie pierwotnych preadipocytów, test ELISA, pomiar zewnątrzkomórkowego zużycia tlenu, real-time PCR, a także elektroforezę SDS-PAGE, Western blot, barwienie roztworem czerwieni olejowej, pomiar akumulacji triacylogliceroli, glicerolu, wydzielania wolnych kwasów tłuszczowych, dokomórkowego transportu glukozy oraz lipogenezy *de novo*. Należy także podkreślić i docenić, że powyższe techniki z pewnością wymagały dużego nakładu pracy. Zastosowane w badaniach analizy laboratoryjne są właściwie dobrane do założonego celu badawczego. Generalnie, ta część pracy została napisana poprawnie, ale pewne uwagi i sugestie nasunęły mi się po analizie tych rozdziałów w pracach oryginalnych i w autoreferacie: 1/ W tej części rozprawy brakuje mi wyjaśnienia dlaczego, oprócz pradipocytów izolowanych z białej i brunatnej tkanki tłuszczowej szczura, w badaniach zastosowano linie komórkową 3T3-L1. 2/ Kolejna uwaga dotyczy opisu poszczególnych metod i analiz wyników. Większość z nich została przedstawiona w sposób precyzyjny i wyczerpujący, ale szczególnie analizę real-time PCR opisano bardzo oszczędnie. W opisie metody real-time PCR zabrakło informacji na temat warunków reakcji, stężeń użytych starterów czy kontroli negatywnych. Proponowałabym przedstawienie warunków reakcji PCR w formie tabeli, wraz z sekwencjami i stężeniami starterów, długością amplikonów PCR i informacją o numerze dostępu GenBank.



Z doświadczenia wiem, że wybór właściwych genów referencyjnych jest bardzo trudny. Co zdecydowało o wyborze genu *GAPDH* i dlaczego zastosowano tylko jeden gen referencyjny? Zbyt lakoniczny jest również opis sposobu analizy uzyskanych wyników. Prosiłabym o przedstawienie wyników eksperymentu walidacyjnego i podanie wydajności reakcji real-time PCR. Opis metody Western blot należałoby uzupełnić o informacje dotyczące kontroli negatywnych. W opisie testu ELISA zabrakło informacji o błędach wewnątrz- i międzyseryjnych. Jakim testem statystycznym sprawdzano czy uzyskane zmienne wykazują/lub nie rozkład normalny? W publikacjach i w autoreferacie nie podano informacji na ten temat. 3/ Chciałabym także zwrócić uwagę na kilka niefortunnych stwierdzeń w polskojęzycznym opracowaniu: „schematy mające przedstawiające” (str. 45), „wpływ adropiny ...określano na komórkach” (str. 53), „pomiar na spektrofotometrze” (str. 58, 60), „na ścieżki żelu podawano” (str. 61), „związanych prążków” (str. 62).

W rozdziale *Wyniki* Doktorantka w jasny i logiczny sposób prezentuje wyniki doświadczeń dotyczących: 1/ Wpływu adropiny na proces adipogenezy komórek 3T3-L1 oraz preadipocytów izolowanych z białej i brunatnej tkanki tłuszczowej. 2/ Wpływu adropiny na proces lipolizy, lipogenezy, dokomórkowego transportu glukozy oraz funkcji endokrynych zróżnicowanych komórek 3T3-L1 i zróżnicowanych preadipocytów białej tkanki tłuszczowej szczura. W swojej pracy Doktorantka wykazała ekspresję genu adropiny i jej receptora (*Gpr19*) we wszystkich badanych komórkach. Stwierdzono, że adropina stymuluje proliferację komórek 3T3-L1 i preadipocytów białej tkanki tłuszczowej poprzez aktywację szklaku ERK1/2 oraz AKT. Wykazano również, że adropina pobudza proliferację preadipocytów brunatnej tkanki tłuszczowej działając poprzez szlak kinazy AKT. Ponadto zaobserwowano, że adropina hamuje różnicowanie badanych komórek w dojrzałe komórki tłuszczowe poprzez obniżanie wewnątrzkomórkowej akumulacji lipidów oraz ekspresji genów stymulujących adipogenezę. Za szczególnie istotny wynik należy uznać wykazanie, że w zróżnicowanych adipocytach białej tkanki tłuszczowej adropina stymuluje lipolizę jednocześnie hamując proces lipogenezy. Bardzo interesujące wydaje się również stwierdzenie, że adropina powodowała wzrost ekspresji genu adiponektyny i obniżenie ekspresji genów wisfatyny i rezystyny w zróżnicowanych adipocytach białej tkanki tłuszczowej. Po analizie tej części rozprawy stwierdzam, że zakres przeprowadzonych badań jest szeroki, a uzyskane wyniki są interesujące i potwierdzają wpływ adropiny na funkcjonowanie tkanki tłuszczowej. Uzyskane wyniki mogą stać się inspiracją do podjęcia kolejnych badań mających na celu określenie roli adropiny w rozwoju otyłości. Dokumentacja graficzna wyników w postaci rycin, zdjęć i tabel jest czytelna i przejrzysta. Doktorantka nie ustrzegła się jednak pewnych niedociągnięć. 1/ W publikacji I i II, na rycinie 1 i w podpisie tej ryciny brakuje oznaczeń dotyczących różnic statystycznych. Na rycinie 2-4 w publikacji I oraz na rycinie 2-5 w publikacji II oznaczenia różnic statystycznych są, ale brakuje ich wyjaśnienia w podpisach do rycin. 2/ W autoreferacie podano, że przedstawione średnie były obliczone na podstawie wyników pochodzących z minimum 5 prób (n=5),



natomiast w pracach oryginalnych w przypadku niektórych wyników podano wartość  $n=3$  lub 4. Proszę o wyjaśnienie tych nieścisłości. 3/ Moim zdaniem badania należało rozszerzyć o analizy dotyczące ekspresji białka adropiny i jej receptora w badanych komórkach. 4/ Pragnę zwrócić uwagę, że skróty nazw białek nie należy pisać kursywą (np. UCP1, PPAR $\gamma$ ).

W *Dyskusji* zamieszczonej w publikacjach oryginalnych oraz w autoreferacie podjęto wnikliwą analizę i interpretację prezentowanych wyników w świetle aktualnej literatury. W moim odczuciu Dyskusja jest wszechstronna i wyczerpująca. Na szczególną pochwałę zasługują schematy i podsumowania dyskusji poszczególnych publikacji i ograniczenia badań zamieszczone w autoreferacie, w których Doktorantka niczym recenzent wymienia słabe strony prezentowanej rozprawy i wskazuje przyszłe kierunki działań. Świadczy to o zrozumieniu tematyki badawczej, dystansie do uzyskanych wyników i dojrzałości naukowej Doktorantki. Opracowanie polskojęzyczne zakończone jest bardzo dobrze sformułowanymi wnioskami i podsumowaniem. Wnioski precyzyjnie odnoszą się do postawionej hipotezy badawczej. W pracach oryginalnych Doktorantka trafnie i syntetycznie podsumowują uzyskane wyniki.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że publikacja I była cytowana już 18 razy, praca II - 5 razy, a praca III - 3 razy (wg bazy Web of Science). Swoje uwagi i sugestie zawarłam po analizie każdego z rozdziałów. Na zakończenie swojej oceny prosiłabym Doktorantkę o odpowiedź, podczas obrony, na następujące pytanie: w jaki sposób uzyskane przez Doktorantkę wyniki mogą przyczynić się do opracowania nowych terapii otyłości bądź sposobów zapobiegania rozwojowi otyłości?

## PODSUMOWANIE

Pragnę stwierdzić z pełnym przekonaniem, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a uzyskane przez Doktorantkę wyniki nie tylko dostarczają nowych danych, które stanowią cenne uzupełnienie badań zmierzających do znalezienia nowych czynników prognozujących rozwój otyłości, ale mogą stanowić podstawę do prowadzenia kolejnych eksperymentów. Trzy oryginalne prace, będące podstawą rozprawy doktorskiej, są rzetelnie przygotowane, zawierają jasno określony cel uzupełniony dobrym opisem przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych wyników oraz merytoryczną dyskusją. Na podkreślenie zasługuje również szeroki zakres prowadzonych badań naukowych oraz kompleksowe podejście do rozpatrywanego problemu. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą z zakresu tematyki prowadzonych badań oraz umiejętnościami w doborze i posługiwaniu się licznymi metodami. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można sądzić, że Doktorantka zdobyła niezbędne doświadczenie i umiejętności przydatne w przyszłej pracy badawczej. Należy również zauważyć, że Doktorantka w całym swoim dorobku naukowym posiada dziesięć publikacji (wg bazy *Web of Science* ilość cytowań wynosi 63 a indeks  $h = 4$ ). Muszę pokreślić, że sformułowane w mojej recenzji uwagi, sugestie, zastrzeżenia czy pytania nie dyskredytują wysokiej wartości zaprezentowanych wyników, lecz



są przyczynkiem do naukowej dyskusji, która zapewne odbędzie się podczas publicznej obrony ocenianej rozprawy. Mam również nadzieję, że zostaną wykorzystane w przygotowaniu kolejnych publikacji oraz w przyszłej pracy naukowej.

## WNIOSEK KOŃCOWY

W moim przekonaniu, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*Udział adropiny w regulacji adipogenezy oraz metabolizmu i funkcji endokrynych adipocytów*” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wszystkie wymagania – określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku *O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki* (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) stawiane rozprawom doktorskim. Na tej podstawie zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny *Nauki Biologiczne* Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Mariami Jasaszwili oraz dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy zaprezentowanych wyników badań oraz ich oryginalny charakter, co znajduje odzwierciedlenie w opublikowaniu ich w czasopismach o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy.

Olsztyn, 19 stycznia 2022 r.

Z poważaniem,

