

Warszawa, 2021.09.06

dr hab. Anna Maria Duszewska, prof. SGGW
Zakład Histologii i Embriologii
Katedra Nauk Morfologicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
duszewskaanna@hotmail.com

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Goryszewskiej-Szczurek pt.:
Rola prokinetycyny 1 i jej receptora PROKR1 w interakcjach pomiędzy zarodkiem
a endometrium podczas wczesnej ciąży u świni

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Waclawik, profesor Instytutu w Zakładzie Mechanizmów Działania Hormonów, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

Przedstawiona do oceny **Rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Goryszewskiej-Szczurek pt.: Rola prokinetycyny 1 i jej receptora PROKR1 w interakcjach pomiędzy zarodkiem a endometrium podczas wczesnej ciąży u świni** jest jednotematycznym opracowaniem, opartym na trzech oryginalnych artykułach opublikowanych w latach 2020-2021. **Rozprawa doktorska** została wykonana w ramach projektu finansowanego z środków dotacji KNOW Konsorcjum "Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność", Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego decyzja nr 05-1/KNOW2/2015 oraz środków statutowych Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

W pierwszej publikacji, wchodzącej w skład Rozprawy doktorskiej: **Goryszewska E., Kaczyński P., Balboni G., Waclawik A., (2020). Prokineticin1– prokineticin receptor 1 signaling promotes angiogenesis in the porcine endometrium during pregnancy. *Biology of Reproduction*, 103(3): 654-668. doi: 10.1093/biolre/ioaa066, Pani mgr Ewelina Goryszewska-Szczurek jest pierwszym autorem, a jej udział w niniejszej publikacji został oceniony na 50%. Praca opublikowana została w czasopiśmie *Biology of Reproduction*, którego IF za 2020 rok wyniósł 3.582, a liczba punktów MEiN= 200. Niniejsza publikacja została uznana przez Towarzystwo Biologii Rozrodu (01.03.2021) najlepszą pracą z zakresu**



biologii rozrodu opublikowaną w roku 2020 i przyznało **Pani mgr. E. Goryszewskiej-Szczurek** nagrodę naukową.

W drugiej publikacji, wchodzącej w skład Rozprawy doktorskiej: **Goryszewska E., Kaczyński P., Baryła M., Waclawik A., (2021b).** Pleiotropic role of prokineticin 1 in the porcine endometrium during pregnancy establishment and embryo implantation. *Biology of Reproduction*, 104(1): 181-196. doi: 10.1093/biolre/ioaa181, **Pani mgr Ewelina Goryszewska-Szczurek** jest pierwszym autorem, a jej udział w niniejszej publikacji został oceniony na 60%. Praca opublikowana została w czasopiśmie *Biology of Reproduction*, którego IF za 2021 rok wyniósł 3.582, a liczba punktów MEiN= 200. Niniejsza publikacja została wyróżniona przez **Editor's choice (Biology of Reproduction)** – 07.01.2021.

W trzeciej publikacji, wchodzącej w skład Rozprawy doktorskiej: **Goryszewska E., Baryła M., Kaczyński P., Waclawik A., (2021a).** Prokineticin 1–prokineticin receptor 1 signaling in trophoblast promotes embryo implantation and placenta development. *Scientific Reports*, doi: 10.1038/s41598-021-93102-1. **Pani mgr Ewelina Goryszewska-Szczurek** jest pierwszym autorem, a jej udział w niniejszej publikacji został oceniony na 55%. Praca opublikowana została w czasopiśmie *Scientific Reports*, którego IF za 2021 rok wyniósł 4.122, a liczba punktów MEiN= 140. Należy podkreślić, że niniejsza publikacja ukazała się również w prestiżowym czasopiśmie, wchodzącym w skład Nature Research journals.

Łączna punktacja publikacji wchodzących w skład cyklu, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi 540 punktów MEiN, a łączny IF wg listy JCR wynosi 11,286. We wszystkich publikacjach **Pani mgr Ewelina Goryszewska-Szczurek** jest pierwszym autorem. Udział pozostałych autorów w poszczególnych publikacjach został potwierdzony w odpowiednich oświadczeniach dołączonych do niniejszej Rozprawy.

Rozprawa doktorska oparta o jednotematyczny cykl publikacji, dotyczy roli prokinetycyny 1 (PROK1) i jej receptora PROKR1 w interakcjach pomiędzy matką a zarodkiem podczas implantacji i tworzenia łożyska. Prokinetycyna 1 (PROK1) jest wielofunkcyjnym białkiem sekrecyjnym, zwanym także czynnikiem wzrostu śródbłónki naczyniowego pochodzenia dokrewnego (EG-VEGF). Ekspresja prokinetycyny 1 (PROK1) i jej receptora PROKR1 zasadniczo jest ograniczona do gruczołów steroidogennych (jajników, jąder, nadnerczy i łożyska) i często komplementarna do ekspresji czynnika wzrostu śródbłónki naczyniowego (VEGF), co sugeruje, że działają one w sposób skoordynowany.

Istnieją mocne dowody, oparte na badaniach *ex vivo*, *in vivo*, *in vitro* oraz badaniach klinicznych, wskazujące na bezpośredni udział systemu PROK1/PROKR zarówno w fizjologicznych, ale również patofizjologicznych aspektach ciąży. PROK1 jest zasadniczo

czynnikiem angiogennym, proliferacyjnym oraz indukującym migrację komórek śródbłonna i ich fenestrację w naczyniach włosowatych pochodzących z gruczołów dokrewnych.

Białko prokinetycyna 1 (PROK1) było badane u wielu gatunków, w tym u bydła, myszy, królika oraz szczura. Jednak najistotniejsze wnioski w odniesieniu do niniejszej **Dysertacji** płyną z badań przeprowadzonych u kobiet, w których stwierdzono, że w żeńskim układzie rozrodczym PROK1 odgrywa kluczową rolę w receptywności endometrium i rozwoju łożyska. W endometrium kobiet ekspresja białka PROK1 osiąga szczyt w środkowej fazie cyklu miesięczkowego, co odpowiada okienku implantacji zarodka. Dlatego PROK1 jest opisywana jako potencjalny biomarker receptywności endometrium człowieka. Ponadto PROK1 bezpośrednio wzmacnia ekspresję genów zaangażowanych w implantację oraz zwiększa adhezję ludzkich trofoblastów do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, co sugeruje bezpośrednią rolę tej cytokiny w interakcji między trofektoderma zarodka a komórkami endometrium w okresie implantacji. W łożysku układ PROK1/PROKR ulega silnej ekspresji i odgrywa wiele funkcji w łożyskowej angiogenezie i proliferacji trofoblastów oraz przeżyciu, migracji i inwazji płodu. Na szczególną uwagę zasługują doniesienia wskazujące, że poziom PROK1 w krwi dodatnio koreluje z jakością zarodków oraz wynikami ciąży u kobiet poddawanych leczeniu IVF. Dlatego u kobiet PROK1 rozważane jest jako nieinwazyjny prognostyczny biomarker implantacji zarodka.

Jednak biorąc pod uwagę specyficzność gatunkową interakcji matka-płód podczas implantacji oraz strukturę powierzchni kosmówki i jej interakcję z endometrium, liczbą warstw oddzielających krążenie płodowe od macicznego (bariera łożyskowa) oraz stopień inwazji, niniejsze badania nad rolą PROK1 i PROKR1 u świni domowej były ze wszech miar uzasadnione.

W **Rozprawie Doktorskiej** wyodrębniono: **Streszczenie** w języku polskim i angielskim; **Wykaz skrótów** w języku polskim i angielskim; **Wstęp** wraz z hipotezą badawczą, celem pracy i zadaniami badawczymi; **Material i Metody**; **Wyniki**; **Dyskusję**; **Podsumowanie i wnioski** oraz **Bibliografia** (102 pozycje). Na końcu zamieszczono **Oświadczenia współautorów publikacji** oraz trzy oryginalne **Publikacje** wraz z załącznikami.

W niniejszej **Rozprawie doktorskiej**, **Doktorantka** postawiła **Hipotezę badawczą**: Prokinetycyna 1 produkowana przez zarodki, jak również przez komórki błony śluzowej macicy świni, działając przez swój receptor (PROKR1) w trofoblaście i endometrium, reguluje procesy zachodzące podczas implantacji zarodka oraz rozwoju łożyska.

Stąd też celem **Dysertacji** było: Określenie roli PROK1 i jej receptora PROKR1 w interakcjach zarodek – macica podczas wczesnej ciąży u świni.



W **Dysertacji** opartej na jednotematycznym cyklu, bazującym na trzech publikacjach, **Doktorantka** wyodrębniła następujące **zadania badawcze** :

1. Charakterystyka profilu ekspresji oraz określenie lokalizacji PROK1 i PROKR1 w endometrium świni podczas wybranych dni cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży – badania *ex vivo* (**Publikacja 1**)
2. Zbadanie wpływu rozwijających się zarodków na ekspresję PROK1 oraz PROKR1 w błonie śluzowej macicy świni – badania *in vivo* (**Publikacja 1**)
3. Określenie wpływu sygnałów zarodkowych (E2, PGE2) na ekspresję PROK1 oraz PROKR1 w endometrium świni – badania *in vivo* (**Publikacja 2**)
4. Zbadanie wpływu estradiolu oraz progesteronu na ekspresję PROK1 oraz PROKR1 w błonie śluzowej macicy świni – badania *in vitro* (**Publikacja 1**)
5. Określenie wpływu PROK1 na ekspresję genów i białek, aktywację szlaków wewnątrzkomórkowych oraz sekrecję czynników zaangażowanych w rozwój wczesnej ciąży w endometrium świni – badania *in vitro* (**Publikacja 1 i Publikacja 2**)
6. Zbadanie wpływu PROK1 na proces angiogenezy w błonie śluzowej macicy świni oraz określenie szlaków wewnątrzkomórkowych zaangażowanych w ten proces – badania *in vitro* (**Publikacja 1**).
7. Określenie profilu ekspresji genów *PROK1* i *PROKR1* oraz wybranych genów związanych z ciążą w zarodkach/trofoblastach świni – badania *ex vivo* (**Publikacja 3**)
8. Określenie wpływu PROK1 na ekspresję genów oraz aktywację szlaków wewnątrzkomórkowych zaangażowanych w rozwój wczesnej ciąży w komórkach trofoblastu świni – badania *in vitro* (**Publikacja 3**)
9. Zbadanie wpływu PROK1 na proliferację i adhezję komórek trofoblastu świni oraz określenie szlaków wewnątrzkomórkowych zaangażowanych w te procesy – badania *in vitro* (**Publikacja 3**)

Materiał do badań pobrano od loszek mieszańców Pietrain x Duroc, będących w okresie dojrzewania, z których część była ciężarna (po inseminacji), a część w naturalnym cyklu rujowym. **Doktorantka** podała, że wszystkie eksperymenty z wykorzystaniem zwierząt zostały przeprowadzone zgodnie z uchwałą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski) w oparciu o art. 1 ustawy z dnia 21. stycznia 2005 r. o doświadczeniach na zwierzętach (zgody nr: 17/2008, 32/2008 oraz 36/2012). W mojej opinii **Doktorantka** powinna wskazać, czy uzyskane w latach 2008 i 2012 zgody spełniają wymogi ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o



ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266).

Doktorantka w sposób klarowny i logiczny przedstawiła opis metodyczny doświadczeń z odniesieniem do poszczególnych publikacji, w których zamieściła szczegółowy opis eksperymentów *ex vivo*, *in vivo*, *in vitro*. Na szczególne uznanie zasługuje zamieszczenie rycin z schematami poszczególnych doświadczeń, co ułatwiło zrozumienie tak złożonego, bo wielopoziomowego układu doświadczalnego.

W swoich badaniach **Doktorantka** wykorzystwała „ogrom” metod, między innymi: RT-PCR, Western Blot, EIA, RIA, ELISA, CellTiter96RAqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Network Formation Assay, Cell Adhesion Assay, co budzi moje uznanie dla warsztatu doświadczalnego **Doktorantki**. Przyznam się, że bardzo zaciekała mnie analiza formowania się struktur kapilaropodobnych przez komórki endotelialne z użyciem nakładki Angiogenesis Analyzer (Rycina 6 w Rozprawie doktorskiej). Dlatego mam nadzieję, że podczas **Obrony** będzie sposobność o tym porozmawiać.

Wyniki zostały przez **Doktorantkę** w sposób konsekwentny i klarowny omówione, z odesłaniem do poszczególnych publikacji.

W rozdziale **Dyskusja**, **Doktorantka** omówiła uzyskane wyniki i przeprowadziła wyczerpującą dyskusję w oparciu o kluczowe pozycje piśmiennictwa naukowego. Na najwyższe uznanie zasługuje zaproponowanie przez Doktorantkę mechanizmu interakcji między PROK1/PROKR1 a zarodkiem i matką podczas implantacji i tworzenia łożyska, co szczegółowo zostało omówione, ale również przedstawione na fantastycznych schematach (Rycina 8 w publikacji 1; Rycina 6 w publikacji 2; oraz Rycina 7 i 8 w publikacji 3).

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów **Doktorantka** wyprowadziła następujące wnioski:

1. Regulacja ekspresji PROK1 i PROKR1 przez zarodki oraz sygnały zarodkowe (E2 oraz PGE2) w błonie śluzowej macicy sugeruje, że PROK1 działa jako mediator sygnałów zarodkowych i poprzez swój receptor PROKR1 bierze udział w przygotowaniu endometrium do przyjęcia zarodka i rozwoju łożyska.
2. Prokinetycyna 1, której ekspresja jest zwiększona w błonie śluzowej macicy świni w okresie implantacji zarodka oraz rozwoju łożyska, działając w sposób bezpośredni i/lub pośredni stymuluje proces angiogenezy zachodzący podczas wczesnej ciąży.
3. Prokinetycyna 1 w endometrium, jak i komórkach trofoblastu świni wykazuje plejotropową rolę poprzez stymulację ekspresji genów i/lub białek zaangażowanych w procesy zachodzące podczas wczesnej ciąży takie jak: kontakt między komórkami, przyleganie, migracja oraz



żywołność komórek, angiogeneza, aktywacja komórek endotelialnych, waskulogeneza, różnicowanie się komórek nabłonkowych, aktywacja leukocytów oraz odpowiedzi immunologicznej. Ponadto, prokinetycyna 1 zwiększając sekrecję PGF2 α , VEGFA, IL6 i IL11 reguluje funkcję wydzielniczą endometrium i bierze udział w tworzeniu stanu przypominającego proces zapalny w okresie implantacji zarodka.

4. Prokinetycyna 1 działając przez receptor PROKR1 w trofoblaście, stymuluje proliferację oraz adhezję komórek trofoblastu w okresie implantacji i rozwoju łożyska.

5. Uzyskane wyniki sugerują, że sygnalizacja PROK1-PROKR1 jest ważnym czynnikiem wspierającym procesy zaangażowane w ustanowienie i rozwój ciąży u świni.

Uzyskane wyniki upoważniły **Doktorantkę** do sformułowania powyższych wniosków, choć moim zdaniem zarówno we wniosku 1 jak i 4 powinno być stwierdzenie, że „u świń”.

Należy podkreślić, że wnioski wynikające z badań **Doktorantki** wnoszą nową wiedzę o roli PROK1 i jej receptora PROKR1 w dialogu pomiędzy matką a zarodkiem podczas implantacji i tworzenia łożyska u świń.

Rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Goryszewskiej-Szczurek jest wybitna, wręcz idealna, właściwie nic nie budzi moich zastrzeżeń, zasługuje na wyróżnienie i o takie wystąpiłam, ale muszę przyznać, że czuję pewien niedosyt, bo nie rozumiem, dlaczego dysponując takimi możliwościami **Doktorantka** nie pokusiła się o zbadanie poziomu PROK1 w krwi świń pod kątem wykorzystania tej cytokiny jako biomarkera implantacji i tworzenia łożyska, tak jak zrobiono to u kobiet.

Podsumowując, Rozprawa doktorska Pani mgr Ewelina Goryszewska-Szczurek pt.: Rola prokinetycyny 1 i jej receptora PROKR1 w interakcjach pomiędzy zarodkiem a endometrium podczas wczesnej ciąży u świni jest oparta na jednotematycznym zbiorze 3 oryginalnych publikacji. **Całkowity IF Pani mgr Eweliny Goryszewskiej-Szczurek wyniósł = 11.286**, co jest osiągnięciem znacząco przekraczającym wymagania stawiane rozprawom doktorskim - Ustawa o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U., nr 65, z dnia 14 marca 2003 roku). Należy podkreślić, że podjęta przez **Panią mgr Ewelinę Goryszewską-Szczurek** tematyka badawcza pozwoliła na osiągnięcie wartościowych wyników, przez co niniejsza **Rozprawa doktorska** charakteryzuje się wyjątkowymi walorami poznawczymi, które wpisują się w światową literaturę naukową i są znaczącym osiągnięciem w dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Bez wątpienia każda z publikacji wchodząca w skład niniejszej **Dysertacji** będzie często cytowana, ponieważ oprócz walorów poznawczych, każda z nich wytycza nowe szlaki badawcze. Wart również podkreślić, że **Doktorantka** wykorzystała nowoczesne i zaawansowane metody, co świadczy



o jej ponadprzeciętnym warsztacie badawczym. **Rozprawa doktorska** jest niezwykle przejrzysta, charakteryzująca się logicznym układem całości, a do tego została starannie przygotowana.

Przekładam zatem **Radzie Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie** wniosek o dopuszczenie **Pani mgr Eweliny Goryszewskiej-Szczurek** do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu nadania stopnia **doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo**.

Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą. Za wyróżnieniem niniejsze **Rozprawy doktorskiej** przemawiają poniższe fakty:

1. Tematyka badawcza podjęta przez **Panią mgr Ewelinę Goryszewską-Szczurek** pozwoliła na określenie roli PROK1 i jego receptora (PROKR1) w interakcjach między matką a zarodkiem podczas implantacji i tworzenia łożyska u świń, przez co niniejsza **Rozprawa doktorska** charakteryzuje się wyjątkowymi walorami poznawczymi, wykraczającymi daleko poza dyscyplinę zootechnika i rybactwo. Zaproponowane mechanizmy oddziaływania PROK1 i jego receptora (PROKR1) wnoszą nową wiedzę i to nie tylko u świń, ale również rzucają światło na przebieg implantacji i tworzenia łożyska u wielu innych gatunków.
2. Wszystkie trzy publikacje **Pani mgr Ewelina Goryszewska-Szczurek** znajdują się na liście JCR a ich łączny IF wynosi 11,286, co jest osiągnięciem znacząco przekraczającym wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Dwie z trzech publikacji wchodzących w skład **Dysertacji**, zostały nagrodzone. Pierwsza z nich przez Towarzystwo Biologii Rozrodu a druga wyróżniona przez **Editor's choice (Biology of Reproduction)**. Należy podkreślić, że trzecia publikacja ukazała się również w prestiżowym czasopiśmie, wchodzącym w skład Nature Research journals.
3. **Pani mgr Ewelina Goryszewska-Szczurek** wykorzystwała w badaniach „ogrom” metod/technik, wymagających nieprzeciętnych umiejętności zarówno na etapie ich stosowania jak i opracowania oraz interpretacji wyników, między innymi: RT-PCR, Western Blot, EIA, RIA, ELISA, CellTiter96RAqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Network Formation Assay, Cell Adhesion Assay, co budzi moje uznanie dla warsztatu doświadczalnego **Doktorantki**.

Anna M. Juszevska