



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Żywienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa

Prof. dr hab. Dorota A. Zięba-Przybylska

Tel. 12 429 72 24

Kom. 601 415 283

Fax: 12 429 75 47

e-mail: rzzieba@cyf-kr.edu.pl



OCENA

PRACY DOKTORSKIEJ MGR KAROLINY DOBRZYŃ

wykonanej w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu

Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

pod opieką naukową Pani dr hab. Magdaleny Kowalik

nt.:

**REGULACJA EKSPRESJI BŁONOWYCH RECEPTORÓW PROGESTERONU
ORAZ ICH FUNKCJA W ŁOŻYSKU KROWY**

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie podjęty w dniu 29 czerwca 2021 r..

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Dobrzyń nt. "Regulacja ekspresji błonowych receptorów progesteronu oraz ich funkcja w łożysku krowy" została wykonana w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, pod opieką naukową Pani dr hab. Magdaleny Kowalik. Praca doktorska została zrealizowana w ramach projektu promotorskiego Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe zwierzę – bezpieczna żywność”, otrzymanego decyzją Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.

Recenzowana praca to manuskrypt liczący 89 stron z wydzielonymi dziewięcioma częściami – rozdziałami. Pierwszą stanowi Wstęp, poprzedzony Streszczeniem w języku polskim i angielskim. Następnie Autorka zamieściła 2-stronicowy Wykaz Skrótów. Na 20-stronach Wstępu Doktorantka bardzo przejrzyście przedstawiła tematykę swojej pracy; w tym omówiła procesy rozrodcze samicy, w tym steroidogenezę, następnie opisała szczegółowo progesteron, jego funkcje w organizmie samicy, mechanizm działania, a na zakończenie omówiła budowę łożyska u ssaków, zwracając szczególną uwagę na udział progesteronu w funkcji łożyska. Każdy z trzech punktów Wstępu zaopatrzony został w jedną lub kilka rycin, które bardzo pomagają w dobrym zrozumieniu tematu, ze względu na ich czytelność i ilustratywność. Następnie Doktorantka w drugim rozdziale: Cele i zadania badawcze pracy zaprezentowała hipotezę badawczą i służące jej realizacji cel pracy i cele szczegółowe. Rozdział trzeci to Materiał i Metody w których znajdziemy podpunkt dotyczący materiału wykorzystanego w doświadczeniach, opis inkubacji skrawków łożyska, następnie dokładnie przedstawienie przebiegu poszczególnych doświadczeń odpowiadających postawionym wcześniej celom badawczym, opis metod analitycznych wykorzystanych w doświadczeniach i analizę statystyczną. Czwarty rozdział to przedstawienie uzyskanych wyników z podziałem na wydzielone wcześniej cele badawcze. Pomiędzy

stronami od 63 do 70 zawarta jest Dyskusja wyników pracy, następnie Wnioski. Literatura to 213 pozycji, z których 140 czyli 66% pochodzi z XXI w.

Recenzja szczegółowa

1. Cele i zadania badawcze pracy: Hipotezą badawczą pracy przedstawionej do recenzji było rozpoznanie czy: progesteron uczestniczy w regulacji funkcji łożyska krowy na drodze pozagenomowej poprzez aktywację receptorów błonowych, których ekspresja jest regulowana przez hormony steroidowe, cytokiny i czynniki produkowane lokalnie w macicy i łożysku.

W celu weryfikacji powyższej hipotezy Doktorantka wyznaczyła główny cel pracy, którym było określenie czynników regulujących ekspresję błonowych receptorów P4 w łożysku oraz zdefiniowanie odpowiedzi komórek łożyska zależnie od ich genomowego lub pozagenomowego pobudzenia przez P4. Ponadto, zaprezentowała 3 cele szczegółowe 1. określenie poziomu ekspresji mRNA oraz immunolokalizację białek błonowych receptorów P4 w łożysku krowy w drugim trymestrze ciąży; 2. określenie czynników biorących udział w regulacji ekspresji błonowych receptorów P4 w łożysku krowy w drugim trymestrze ciąży – tu w trzech podpunktach wymienione zostały czynniki na które zwrócono uwagę w pracy: P4, E2, TNF α , IL1, IL6, IL8, INF γ , LIF, EGF, FGF7, IGF1, VEGF, TGF β ; 3. zdefiniowanie odpowiedzi komórek łożyska na P4 zależnie od ich genomowego lub pozagenomowego pobudzenia w tym: określenie wpływu inhibitora transkrypcji aktynomycyny D, antagonisty PGR, inhibitora PGRMC1, koniugatu P4-BSA na ekspresję błonowych receptorów P4 w skrawkach łożyska krowy oraz określenie wpływu P4 podanego z wyżej wymienionymi czynnikami na ekspresję błonowych receptorów P4 w skrawkach łożyska krowy.

Weryfikacja hipotezy badawczej i cele pracy zostały zrealizowany poprzez:

- pozyskanie do badań macic od 5 ciężarnych krów w drugim trymestrze ciąży w celu wyizolowania skrawków łożyszcz z zachowaniem połączeń maczyno-płodowych; model ten umożliwiający badanie funkcji łożyska krowy w warunkach pozaustrojowych miało możliwość poznać oceniając rozprawę doktorską Pani dr Anny Marii Wojciechowskiej i uważam go nie tylko za bardzo dobry, ale właściwy dla przedstawionych doświadczeń. Ponadto pozyskano kosmówkę i endometrium. Tkanki te posłużyły do inkubacji i określenia ekspresji genów receptorów błonowych P4;
- inkubację 24-godziną pojedynczych skrawków łożyszcz, kosmówki gładkiej i endometrium;
- immunolokalizację w łożyszczach błonowych receptorów progesteronu;
- poddanie skrawków łożyszcz 6 i 24-godzinnej inkubacji z P4, E2, P4 łącznie z E2;
- inkubacji 6 i 24-godzinnej skrawków łożyszcz z cytokinami, czynnikami wzrostu;
- inkubacji 6 i 24-godzinnej skrawków łożyszcz z P4, aktynomycyną D, antagonistą PGR, inhibitorem PGRMC1, koniugatem P4-BSA oraz P4 z każdym wymienionym czynnikiem.

Doświadczenia *in vitro* przeprowadzono w 5 powtórzeniach, a analizę IHC w trzech.

2. Poprawność wyboru i opisu metod badawczych. Stwierdzam z pełnym przekonaniem, że wykorzystanie w badaniach przez Doktorantkę inkubacji *in vitro* skrawków łożyszcz, analizę ich żywotności przy pomocy testu AlamarBlue, oznaczenia stężenia hormonów steroidowych w pożywce hodowlanej w tym P4 i E2, prostaglandyn (PGE i PGF2 α) przy pomocy testów immunologicznych, zbadanie ekspresji wybranych 5 genów z wykorzystanie techniki Real-Time PCR, techniki immunohistochemicznej stanowią o doskonałej znajomości warsztatu naukowego Doktorantki, co potwierdza bardzo szczegółowy opis stosowanych technik w pracy. Poprawne są także testy do analiz statystycznych przy opracowaniu wyników.

3. Nowatorskość tematyki badawczej. W Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu IRZiBŻ PAN w Olsztynie prowadzone są prace nad genomowym i pozagenomowym działaniem progesteronu, a Promotor dysertacji doktorskiej Pani dr hab. Magdalena Kowalik jest rozpoznawalnym w świecie nauki badaczem mechanizmu działania progesteronu w kontekście procesów rozrodczych krowy. Zatem doświadczenia w niniejszej pracy doktorskiej jak najbardziej wpisują się w nurt prowadzonych w Zakładzie badań. Uwzględnienie w przeprowadzonych doświadczeniach modelu badawczego zawierającego dwa komponenty – matki i płodu, z funkcjonalnymi połączeniami maczyno-płodowymi

stanowi o nowatorskości tematyki badawczej. Doktorantka chcąc określić oddziaływanie wybranych czynników na połączenia nabłonkowo-kosmówkowe i aktywność sekrecyjną łożyska krowy, w pierwszej kolejności musiała opracować izolację łożyszcz. Nie tylko opanowała Ona sposób izolacji skrawków łożyszcz łożyska krowy z zachowaniem integralności części płodowej (liścienie) i macicznej (karunkule – brodawki maciczne), ale poddała je także długotrwałej inkubacji przez 6 i 24-godziny. Niewątpliwie była to trudna i długotrwała praca, która uwieńczona została sukcesem. Łożysko – przejściowy narząd płodowy pełni zasadniczą rolę w wymianie gazów, produktów energetycznych i budulcowych oraz ich metabolitów pomiędzy krwią matki a krwią płodu. Drugą ważną funkcją łożyska jest wytwarzanie hormonów. Część płodową łożyska stanowi unaczyniona kosmówka, część maciczną rozrośnięta i obficie unaczyniona część błony śluzowej macicy, która wchodzi w kontakt z kosmówką. U przeżuwaczy występuje łożysko łącznotkankowo-kosmówkowe (*placenta syndesmochorialis*), w którym 5 błon rozdziela krążenie krwi matki od krążenia krwi płodu. A mianowicie: tkanka łączna błony śluzowej i śródbłónki jej naczyń, nabłonek kosmków, ich tkanka łączna i śródbłonek ich naczyń. Jak do tej pory nie ma w literaturze badań prowadzonych w warunkach *in vitro* – hodowli eksplantów łożyszcz krowy w celu określenia działania genomowego i pozagenomowego progesteronu. Stąd uważam, że wykorzystanie unikalnego modelu badawczego i licznych technik badawczych w celu uzyskania unikatowych wyników stanowią o wysokiej ocenie przedstawionej pracy.

4. Dyskusja jako odniesienie do danych literaturowych. Doktorantka w sposób umiętny i ciekawy przeprowadziła dyskusję interpretując swoje wyniki i odnosząc je do danych literaturowych prac prowadzonych na macicach kobiet, owiec, czy gryzoni. W Dyskusji bardzo sprawnie analizowała otrzymane wyniki i prezentowała mechanizmy działania progesteronu w kontekście jego pozagenomowego działania. Sugerowała w jakie procesy rozrodcze mogą być zaangażowane receptory mPR, na co może w ten sposób wpływać progesteron i co reguluje jego pozagenomowe działanie. Ponadto, Doktorantka zwróciła w Dyskusji uwagę na proces implantacji blastocysty w kontekście wykorzystanych w pracy czynników wzrostu czy cytokin. Szczególnie moją uwagę zwróciła część Dyskusji dotycząca roli czynników modulujących działanie P4 na poziom ekspresji receptorów błonowych P4. Ta część Dyskusji prowadzona jest bardzo ciekawie z opisaniem możliwych ścieżek działania progesteronu z konkluzją o integracji różnych mechanizmów działania, co wskazuje na naukową dojrzałość Autorki pracy. Wykorzystanie w pracy 219 pozycji literatury świadczy także o bardzo dobrym opanowaniu tematyki problemu przez Doktorantkę.

5. Wnioski. Pracę doktorską wieńczą wnioski, które stanowią odpowiedź na postawioną hipotezę badawczą i zakres problematyczny celów szczegółowych.

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Karoliny Dobrzyń stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe. Starannie przemyślana, a następnie konsekwentnie zrealizowana koncepcja pracy, opartej na nowoczesnych analizach, badaniach na nowatorskim modelu *in vitro* – inkubacji eksplantów łożyszcz krowy, pozyskanych w drugim trymestrze ciąży, pozwoliła na obiektywną i krytyczną ocenę problemów postawionych w trzech celach szczegółowych. Dysertacja świadczy o dużej biegłości Doktorantki w poruszanej przez Nią tematyce odnoszącej się do określenia ekspresji i lokalizacji błonowych receptorów progesteronu i sprecyzowania czynników zaangażowanych w ich regulację w łożysku krowy w czasie drugiego trymestru ciąży. Umiejętność krytycznej dyskusji otrzymanych wyników świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na zakończenie chciałabym skierować do Doktorantki kilka pytań, będących nie krytyką a uzupełnieniem informacji, których nie znalazłam w pracy:

1. Dlaczego w Doświadczeniu 1 nie zamrożono pozyskanych z macic skrawków łożyszcz, endometrium i kosmówki gładkiej w -80 st. po ich izolacji, lecz dopiero po 24 godzinnej inkubacji, czemu miała służyć inkubacja skrawków?
2. Dlaczego wybrano do inkubacji skrawków 6 i 24 godziny. To duża różnica czasowa, szczególnie, że skrawki preinkubowano wcześniej przez okres 2h.

3. Czy może Pani opisać przypuszczalny mechanizm działania mPR w procesie luteoliny CL, o czym wzmiankuje Pani w Dyskusji pracy.
4. Chciałabym zwrócić uwagę na częste stosowane zapożyczenia językowe, słowo placentom zamiast łożyszcze, medium/media zamiast pożywka/pożywki.
5. Proponuje przy przygotowaniu manuskryptów pracy ujednolicić dawki związków i przedstawić je np. w ng/ml, obecnie nawet w jednym doświadczeniu część związków podana jest w molach a pozostałe w ng/ml.

KONKLUZJA

Rozprawę doktorską nt. „*Regulacja ekspresji błonowych receptorów progesteronu oraz ich funkcja w łożysku krowy*” oceniam wysoko. Podjęty przez Doktorantkę temat jest istotny z naukowego i aplikacyjnego punktu widzenia. Pragnę podkreślić, iż wykorzystane techniki eksperymentalne i metody analiz laboratoryjnych umożliwiły uzyskanie nowatorskich i wiarygodnych wyników.

Z przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska nt. „*Regulacja ekspresji błonowych receptorów progesteronu oraz ich funkcja w łożysku krowy*” i indywidualny wkład Doktorantki spełniają wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i zwraca się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Dobrzyń i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



prof. dr hab. Dorota Zięba-Przybylska

Kraków, 18 sierpnia 2021 roku