

Prof. dr hab. Ewa Gregoraszcuk
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie



Recenzja

Pracy doktorskiej mgr Eweliny Goryszewskiej-Szczurek pt. „Rola prokinetycyny i jej receptora PROKR1 w interakcjach pomiędzy zarodkiem a endometrium podczas wczesnej ciąży u świni” wykonanej w Zakładzie Mechanizmów Działania Hormonów, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Wacławik, prof. Instytutu.

Pracę doktorską o powyższym tytule opracowano zgodnie z wytycznymi wynikającymi ze znowelizowanej *Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r- Przepisy wprowadzające- Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U z 2018 r, poz. 1669) w zw. z art. 20 ust. 5 z dnia 14.03.2003 Roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003, Nr 65, poz.595 z poz. zm.) . Nowa forma przygotowania rozprawy doktorskiej w Polsce, tradycyjna już od kilkunastu lat w krajach skandynawskich, a ostatnio obowiązująca na wielu uniwersytetach także w Polsce np. w Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie od 2011 roku, sprowadza się do konieczności wydania przez Recenzenta opinii w oparciu o opublikowane i zrecenzowane już przez specjalistów publikacje. Zwykle poprzedzona jest kilkustronicowym wstępem, krótkim streszczeniem opublikowanych prac, podsumowaniem i wnioskami.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska pomimo, że wynik jej zostały już opublikowana jest opracowana w postaci rozprawy liczącej 52 strony bez uwzględnienia dołączanych, opublikowanych prac. Zawiera: 1) Streszczenie w języku polskim (5-6); 2) Streszczenie w języku angielskim (7-6); 3) wykaz stosowanych skrótów (9-12); 4) Wstęp (13-16); 5) Materiał i Metody (18-31); 6) Wyniki (32-30); 7) Dyskusja i podsumowanie oraz wnioski (40-51); 8) Bibliografia (51-58); 9) Oświadczenia współautorów (50-62); 10) oraz xero 3 opublikowanych prac.

Załączone do rozprawy 3 publikacje to:

1. Goryszewska E, Kaczynski P, Balbonu G, Waclawik A. Prokineticin 1- prokineticin receptor 1 signaling promotes angiogenesis in the porcine endometrium during pregnancy. *Biology of Reproduction* 2020, 103, 654-668. IF-3,582
2. Goryszewska E, Kaczynski P, Baryła M, Waclawik A. Pleiotropic role of prokineticin 1 in the porcine endometrium during pregnancy establishment and embryo implantation. *Biology of Reproduction* 2021, 104, 181-196. IF-3,582
3. Goryszewska E, Baryła M, Kaczynski P, Waclawik A. Prokineticin 1- prokineticin receptor 1 signaling in trophoblast promotes embryo implantation and placental development. *Scientific Reports* 2021 doi:10.1038/s43598-021-93102-1. IF- 4,122

Są to prace zespołowe, w których autorka jest pierwszym autorem z udziałem 50-60%.

Przy tak obszernych badaniach z zastosowaniem metod *ex vivo*, *in vivo* i *in vitro* oceniam wkład autorki, jako znaczący.

Tematyka pracy doktorskiej wpisuje się z w tematykę badań prowadzonych od lat w Zakładzie Mechanizmów Działania Hormonów przez Pana prof. dr hab. Adama Zięcia, który już 2008 opublikował pracę dotyczącą regulacji procesów implantacji i dialogu pomiędzy matką i zarodkiem u świni. Współautorem tej publikacji była także obecna promotorka dr hab. Agnieszka Waclawik, która na początku z prof. Adamem Zięcikiem a potem swoim zespołem kontynuowała te badania.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska rozwija tą, jakże ważną, tematykę badawczą wnosząc nowe dane dotyczące roli prokinetycy.

Ostatnio, w tkankach steroidogennych, opisano i wykazano ekspresję nowej rodziny czynników angiogennych, zwanych czynnikami wzrostu śródbłonna naczyńowego pochodzenia endokrynno-gruczołowego (EG-VEGF) /prokinety (PK).

Autorka postawiła hipotezę, że prokinetycy-1 jest produkowana przez zarodki i komórki błony śluzowej macicy i działając przez swój receptor w trofoblaście i endometrium reguluje procesy implantacji i rozwoju łożyska.

Aby udowodnić tą hipotezę autorka zastosowała zarówno badania ex vivo, in vivo i in vitro oraz zastosowała wiele nowoczesnych metod.

Badania ex vivo posłużyły do określenia profilu ekspresji genu i białka PROK1 i PROKR1 oraz lokalizacji tych białek w błonie śluzowej macicy. Wykazała wzrost zarówno ekspresja PROK1 i PROKR1 w okresie implantacji oraz rozwoju łożyska (zad 1)

Ponadto stosując metody ex vivo określiła profil ekspresji genu PROK1, PROKR1 oraz wybranych genów związanych z ciążą w zarodki/trofoblastie. Wykazała wzrost ekspresji PROK1 wraz z trwaniem ciąży i najwyższy poziom PROKR1 podczas rozwoju łożyska oraz wybranych genów w okresie implantacji i rozwoju łożyska. (Zad.7)

Te badania zostały uzupełnione o badania in vitro mające na celu określenie wpływu PROK1 na ekspresję genów oraz aktywację szlaków wewnątrzkomórkowych zaangażowanych w rozwój wczesnej ciąży w komórkach trofoblastu. (Zad.8,9)

Wyniki tych badań wyraźnie wskazują na wpływ PROK1 na komórki trofoblastu poprzez zwiększenie ekspresji genów zaangażowanych w proces angiogenezy, regulację odpowiedzi immunologicznej, wpływu na proliferację i adhezję i inwazyjność komórek trofoblastu. Jako mechanizm wskazuje aktywację szlaków MAPK, PIK3, AKT, mTOR i syntazy cAMP.

Badania in vivo: unikalny model ciąży jednostronnej wykorzystała do wykazania wpływu obecności zarodka na ekspresję PROK1 i PROKR1 w błonie śluzowej macicy oraz **model domacicznego podawania hormonów** w celu wykazania wpływu zarodkowych sygnałów (E2 i PGE2) na ekspresję PROK1 i PROKR1 w endometrium świni.

Stosując model in vivo ciąży jednostronnej dowiodła, że obecność zarodka stymuluje lokalnie ekspresję genu PROK1 i PROKR1 a także, że ekspresja jest dużo wyższa w endometrium zwierząt ciężarnych w porównaniu z cyklem.

Stosując model domacicznego podawania do jednego rogu macicy hormonów wykazała stymulujący wpływ E2 na ekspresję genu PROK1 w rogu iniekcji, działanie PGE2 w obu rogach oraz synergistyczne działanie E2 i PGE2 w rogu podania.

Badania *in vitro* umożliwiły wgłębienie się w molekularne mechanizmy działania PROK1.

Dotyczyły określenia wpływu E2 i P4 na ekspresję PROK1 i PROKR1 w błonie śluzowej macicy. Wykorzystując skrawki błony śluzowej macicy określiła wpływ *in vitro* różnych dawek E2 i P4 wykazując ich samodzielne, ale też synergistyczne działanie na ekspresję PROK1 i PROKR1 w błonie śluzowej macicy.

Badania *in vitro* pozwoliły także na określenie wpływu PROK1 na ekspresję genów i białek w endometrium macicy oraz aktywację szlaków wewnątrzkomórkowych i sekrecję czynników zaangażowanych w rozwój wczesnej ciąży

Wykazała wpływ PROK1 na zwiększoną ekspresję genów syntaz prostaglandyn i sekrecję PGF2 α , wskazała aktywację fosforylacji MAPK i PTK2 oraz zwiększenie ekspresji genów i białek zaangażowanych w proces angiogenezy, regulację adhezji i inwazyjności zarodka, regulację odpowiedzi immunologicznej i proliferację komórek podczas wczesnej ciąży.

Realizując tak liczne zadania badawcze posłużyła się metodami RT-PCR, Western blot, immunocytochemicznymi, EIA/ELISA, RIA.

Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie programu Ingenuity Pathways Analysis w celu zidentyfikowania pleiotropowej roli PROK1 w endometrium i trofoblaście wskazując na szerokie spektrum jej działania zarówno w endometrium jak i trofoblaście.

Obszerna i prawidłowo przeprowadzona dyskusja kończy się stwierdzeniem, że PROK1 działa, jako mediator sygnału zarodkowego wpływając na procesy związane z osiągnięciem receptywności przez endometrium, implantacji zarodka oraz rozwojem łożyska. Dyskusja kończy się 11 punktami podsumowania i 5 wnioskami. Na końcu rozprawy dołączono 103 pozycje literatury i 3 opublikowane prace.

Z obowiązku recenzenta tej rozprawy stwierdzam, że tytuł rozprawy doktorskiej i jej treść odzwierciedlają tematykę i wyniki badań zawartych w publikacjach dołączonych do manuskryptu. Zarówno tematyka i wyniki nie budzą najmniejszych zastrzeżeń. Co więcej budzą mój podziw? Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowanie zarówno badań *ex vivo*, bardzo trudnych metod *in vivo*, ale także zgłębienie mechanizmów przy zastosowaniu metod *in vitro*.

Biorąc pod uwagę fakt, że każda z załączonych publikacji, ukazujących się w prestiżowych czasopismach naukowych, była recenzowana przez przynajmniej 3 niezależnych recenzentów, nie czuje się upoważniona do przeprowadzenia dodatkowych recenzji dołączonych publikacji.

W ocenianej rozprawie doktorskiej trudno jest wskazać uwagi krytyczne. Może podam tylko, że według recenzenta niepotrzebny był ogrom pracy włożony w przygotowanie rozprawy. Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest zarówno opracowaniem, jakie dawniej wymagano w przypadku rozpraw doktorskich, oaz przedstawieniem opublikowanych prac wymaganych obecnie. Mam nadzieję, że doktorantka, ten ogrom pracy włożony do przygotowania tej formy rozprawy zostanie wykorzysta do przygotowania pracy przeglądowej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Rola prokinetycyny i jej receptora PROKR1 w interakcjach pomiędzy zarodkiem a endometrium podczas wczesnej ciąży u świni”, spełnia wszystkie wymagania określone w artykule 179 ust.2 i 3 *Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r- Przepisy wprowadzające- Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U z 208 r, poz. 1669) w zw. Z art. 20 *Ustawy 5 z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. z 2003, Nr 65, poz.595 z poz. zm.) stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Eweliny Goryszewskiej-Szczurek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ja, niżej podpisana wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie wniosku

Na wysoką wartość uzyskanych wyników wskazuje opublikowanie ich w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (sumaryczny IF = 11,287). Jedna z tych publikacji uznana została, jako najlepsza praca z zakresu biologii rozrodu i nagrodzona przez Towarzystwo Biologii Rozrodu. Druga publikacja wyróżniona, jako Editor's choice.

Autorka, po raz pierwszy, wykazała pleiotropowy wpływ PROK1 na endometrium. Wykazała, że sygnalizacja PROK1/PROKR1 w błonie śluzowej macicy i trofoblaście bierze

udział w stymulacji genów i białek zaangażowanych w angiogenezę, odpowiedź immunologiczną, adhezję i inwazję trofoblastu, co sprawia, że wyniki tych badań mogą mieć znaczenie aplikacyjne.

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej mają wyjątkowe walory poznawcze i użytkowe. Praca wyróżnia się oryginalnością metod badawczych i wysokim stopniem ich opanowania przez doktorantkę. Potwierdzają to opisy udziału poszczególnych autorów na końcu opublikowanych prac, jak również oświadczenia współautorów o procentowym udziale w powstaniu publikacji, zamieszczonym na końcu rozprawy doktorskiej.

Zdaniem recenzenta nie budzi najmniejszej wątpliwości, że praca ta powinna zostać wyróżniona.

Recenzent deklaruje brak konfliktu interesów w przygotowaniu recenzji oraz wniosku o nagrodzenie pracy doktorskiej.


Prof. dr hab. Ewa L. Gregoraszczyk