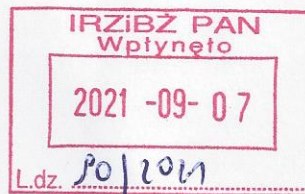


dr hab. Małgorzata Grzesiak
Zakład Endokrynologii
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Kraków, 2 września 2021 r.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Dobrzyń
pt. "Regulacja ekspresji błonowych receptorów progesteronu
oraz ich funkcja w łożysku krwi"**

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Dobrzyń została wykonana w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, pod kierunkiem Pani dr hab. Magdaleny Kowalik. Recenzowana praca to 89-stronicowy manuskrypt zawierający: streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cele i zadania badawcze pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i bibliografię, na którą składa się 213 cytowanych pozycji. Badania zrealizowano w ramach projektu promotorskiego Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe zwierzę – bezpieczna żywność” Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Procesy rozrodcze samic ssaków są regulowane poprzez system oddziaływań hormonalnych, wśród których zasadniczą rolę odgrywa oś podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowa. Produkowane lokalnie w jajniku hormony steroidowe, czyli estradiol i progesteron, wpływają na funkcjonowanie podwzgórza i przysadki mózgowej na zasadzie sprzężeń zwrotnych, ale także regulują procesy zachodzące w żeńskim układzie rozrodczym. W przedłożonej dysertacji Doktorantka podjęła się kontynuacji badań, prowadzonych dotychczas w macierzystym Zakładzie, nad rolą progesteronu i mechanizmem jego działania w układzie rodnym krwi. Hormon ten dzięki swojemu wielokierunkowemu działaniu uczestniczy w regulacji cyklu płciowego, jak również w ustaleniu oraz utrzymaniu ciąży. Początkowo źródłem progesteronu jest ciało żółte, które u niektórych gatunków ssaków pozostaje jedynym istotnym źródłem tego hormonu przez

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: +48 12 664 50 98

cały okres ciąży, natomiast w innych przypadkach produkcję progesteronu przejmują łożysko. Łožysko stanowi zarówno miejsce syntezy, jak i działania progesteronu, o czym świadczy obecność jego receptorów w tym narządzie. Dotychczas wykazano ekspresję jądrowych i błonowych receptorów progesteronu typu PGRMC w łożysku ssaków, jednakże nie są do końca poznane czynniki wpływające na ich ekspresję. Niektóre badania wskazują na możliwy wpływ steroidów oraz uwalnianych w trakcie ciąży cytokin i czynników wzrostu, które biorą udział w regulacji macicznego układu immunologicznego, implantacji zarodka oraz pobudzaniu wzrostu i różnicowania łożyska. Skłania to niewątpliwie do pogłębiania wiedzy w tym zakresie.

W ostatnich latach udowodniono, że klasyczny mechanizm działania progesteronu poprzez receptory jądrowe nie wyjaśnia wszystkich efektów wywołanych przez ten hormon w komórkach docelowych. Wykazanie możliwości wywierania przez progesteron szybkiego pozagenomowego działania w tkankach układu rozrodczego samic ssaków oraz odkrycie błonowych receptorów progesteronu (PGRMC i mPR) uzasadnia potrzebę prowadzenia badań w celu określenia rzeczywistego mechanizmu działania progesteronu, warunkowanego prawdopodobnie poprzez mikrośrodowisko danej tkanki oraz lokalnie wydzielane czynniki. Zatem uważam, że podjęte w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania dotyczące wykazania ekspresji mRNA błonowych receptorów progesteronu oraz ich lokalizacji w łożysku krowy, a także określenie czynników regulujących ekspresję błonowych receptorów progesteronu w łożysku są niezwykle interesujące i merytorycznie uzasadnione. Podjęta tematyka wykazuje cechy nowatorskie, a uzyskane wyniki mogą przyczynić się do poszerzenia aktualnego stanu wiedzy na temat złożoności działania progesteronu w łożysku oraz wyjaśnienia mechanizmu kontrolującego procesy fizjologiczne i patologiczne zachodzące w łożysku.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani Karoliny Dobrzyń została przygotowana bardzo skrupulatnie i precyzyjnie pod względem edytorskim i graficznym. Należy podkreślić, że zamieszczone schematy własne obrazujące drogi działania progesteronu oraz podsumowujące uzyskane wyniki są niezwykle cennym wzbogaceniem pracy oraz ułatwiają podążanie za treścią pracy.

Na 21 stronach **Wstępu**, Doktorantka w sposób przejrzysty i zwięzły przedstawiała syntezę progesteronu w jajniku, jego funkcje w układzie rozrodczym samicy, a także możliwe mechanizmy działania w komórkach docelowych. Rzeczowo opisała klasyczny genomowy mechanizm działania

oraz scharakteryzowała izoformy jądrowego receptora progesteronu. W tym rozdziale Pani Karolina Dobrzyń dokonała także przeglądu piśmiennictwa dotyczącego aktualnego stanu wiedzy na temat pozagenomowego działania progesteronu w tkankach żeńskiego układu rozrodczego, przedstawiając charakterystykę dwóch grup receptorów błonowych (PGRM i mPR), co uzasadnia konieczność podjęcia badań w tym kierunku. Na koniec tej części Doktorantka syntetycznie opisała budowę łożyska, z uwzględnieniem łożyska krowy, oraz jego funkcję wydzielniczą. W mojej opinii, wszystkie zagadnienia poruszane we Wstępie zostały przedstawione wyczerpująco. Świadczy to o dobrym zapoznaniu się Doktorantki z zakresem omawianej tematyki oraz umiejętności doboru i selekcji właściwego piśmiennictwa. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na dwa aspekty sygnalizowane we Wstępie. Po pierwsze, na stronie 10 (podrozdział 2.1. *Synteza progesteronu*) Doktorantka wymienia lipoproteiny o niskiej gęstości oraz estry cholesterolu zmagazynowane w kroplach lipidowych jako główne źródła cholesterolu w syntezie progesteronu. Należałoby tutaj również wspomnieć o możliwości syntezy *de novo* z octanów. Po drugie, w tym samym podrozdziale na stronie 11 Doktorantka pisze o przekształceniu progesteronu w 17 α -hydroksyprogesteron przy udziale enzymu CYP17, który posiada aktywność 17 α -hydroksylazy. Enzym ten wykazuje także aktywność 17,20-liazy, stąd jego pełna nazwa brzmi 17 α -hydroksylaza/17,20-liaza.

Hipoteza badawcza pracy została sformułowana poprawnie i zakłada udział progesteronu w regulacji funkcji łożyska krowy poprzez aktywację receptorów błonowych, których ekspresja jest regulowana poprzez czynniki produkowane lokalnie w macicy i łożysku. Doktorantka postawiła sobie bardzo jasne i ambitne cele zmierzające do weryfikacji hipotezy badawczej. Polegały one na określeniu ekspresji mRNA dla błonowych receptorów progesteronu oraz ich immunolokalizacji w łożysku krowy w drugim trymestrze ciąży, a także wskazaniu czynników (steroidów, cytokin, czynników wzrostu) biorących udział w regulacji ich ekspresji. Pani mgr Dobrzyń postawiła sobie także za cel zdefiniowanie odpowiedzi komórek łożyska krowy w zależności od ich genomowego lub pozagenomowego pobudzenia. Na podkreślenie zasługuje fakt, że są to pierwsze badania dążące do pełnego wyjaśnienia mechanizmu działania progesteronu w łożysku krowy, co niewątpliwie może przyczynić się do zrozumienia podłoża zmian fizjologicznych i patologicznych zachodzących w ciąży u bydła.

Materiał i Metody zostały opisane na 11 stronach manuskryptu. Rozdział ten zawiera dokładną charakterystykę materiału badawczego, uzasadnienie wykorzystania łożysk krowy z drugiego trymestru ciąży, opis preparatyki

skrawków placentomów, endometrium i kosmówki gładkiej, a także precyzyjny opis przebiegu poszczególnych doświadczeń. Doktorantka zastosowała model badawczy, opracowany uprzednio w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu IRZiBŻ PAN, polegający na inkubacji skrawków placentomów umożliwiającej badanie funkcji łożyska *in vitro*. Warto podkreślić, iż jest to model fizjologiczny, ale jednocześnie wymagający zapewnienia optymalnych warunków, co dowodzi niewątpliwie ogromu pracy włożonej w przeprowadzenie zaplanowanych doświadczeń. Oprócz opanowania metodyki hodowli *in vitro*, Doktorantka wykazała się znajomością metody real-time PCR, immunohistochemii oraz metody immunoenzymatycznej. Według mojej oceny, są to narzędzia wystarczające do weryfikacji postawionej hipotezy badawczej. Jednakże zabrakło mi wykorzystania metody Western blot do określenia ekspresji białka receptorów błonowych PGRMC i mPR w skrawkach endometrium, kosmówki gładkiej i placentomów, co moim zdaniem powinno zostać uzupełnione podczas przygotowywania publikacji do druku. Na pochwałę zasługuje przeprowadzenie testowania genu referencyjnego i wykazanie największej stabilności *GAPDH* w łożysku krowy. Doktorantka dała się w ten sposób poznać jako rzetelny młody naukowiec stosujący zasady dobrej praktyki laboratoryjnej.

Wyniki zamieszczono na 20 stronach manuskryptu. Rozdział ten jest w większości czytelny i zawiera precyzyjny opis uzyskanych wyników. Graficzna dokumentacja w postaci wykresów jest prawidłowa. Doktorantka podsumowała dodatkowo otrzymane rezultaty na wspólnym schemacie (Ryc. 29, strona 70), który pozwala całościowo spojrzeć na uzyskane wyniki. Moja uwaga dotyczy braku wyrażenia „mRNA” w opisie osi Y na Ryc. 10 A, B i C (strona 43), a także w samym opisie ryciny. Dodatkowo, można rozważyć przeredagowanie Ryc. 11 i 12 podczas przygotowywania publikacji i wprowadzić oznaczenia poszczególnych struktur w tkance, a pozytywną reakcję zaznaczyć strzałkami w jednym kolorze, zamiast użycia pięciu różnych.

Dyskusja została przeprowadzona na 8 stronach manuskryptu w sposób bardzo rzeczowy i skrupulatny. Biorąc pod uwagę, że spośród badanych czynników jedynie progesteron, estradiol, czynnik martwicy nowotworu α oraz transformujący czynnik wzrostu β wykazały wpływ na ekspresję receptorów typu mPR, przedstawiona interpretacja wyników jest logiczna i nie budzi wątpliwości, a konkluzje wskazują na złożoność procesów regulacyjnych i synergistyczne działanie wielu czynników.

Rozprawę kończy 6 **Wniosków**, które są poprawne i wynikają z otrzymanych rezultatów, z wyjątkiem wniosku 2 (strona 71), który powinien zostać przeredagowany. Ekspresja białek dla błonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy nie została potwierdzona metodą Western blot, a jedynie przeprowadzono ich lokalizację. Stąd poprawne będzie użycie słowa „lokalizacja” zamiast „ekspresja” białek.

PYTANIA I UWAGI

1. W pracy wykorzystano macice ciężarnych krów pobrane bezpośrednio po uboju. Czy przeprowadzone badania wymagały zgody Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach?
2. Czy przeciwciała pierwszorzędowe użyte w immunohistochemii były specyficzne dla krowy? Czy była przeprowadzona walidacja przeciwciał na tkankach krowich metodą Western blot? Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie tej kwestii.
3. Na stronie 41 (wersy 3 i 4 od góry) Doktorantka pisze, że w kontrolach negatywnych barwienia immunohistochemicznego przeciwciała pierwszorzędowe zastąpiono surowicą końską. Pragnę zwrócić uwagę, że lepszą kontrolą negatywną byłoby zastosowanie nieimmunizowanej surowicy pochodzącej od gatunku zwierzęcia, od którego pochodzi przeciwciało pierwszorzędowe.
4. Analiza statystyczna uzyskanych wyników została przeprowadzona z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu *post-hoc* Duncana. Zdecydowanie brakuje szczegółowego wyjaśnienia na jakiej podstawie wybrano ten test. Proszę o uzupełnienie tych informacji.
5. Chciałabym poznać zdanie Doktorantki na temat możliwości zaplanowania dalszych badań w celu wyjaśnienia proponowanego kompleksowego działania czynników regulujących ekspresję receptorów błonowych progesteronu w łożysku krowy. Jakie metody badawcze mogłyby być zastosowane, aby wyjaśnić złożoność tej regulacji?
6. Drobne błędy redakcyjne i stylistyczne: strona 13 (16 wers od góry): cytacja *Druckman 2005* powinna brzmieć *Druckman i Druckman 2005*; strona 27 (3 wers od dołu): powinno być „siarczan dehydroepiandrosteronu”; strona 28 (1 wers od góry): powinno być „siarczan hydroksydehydroepiandrosteronu”; strona 63 (wers 18 od góry): powinno być *Wojciechowska i wsp. 2017*.

PODSUMOWANIE

Rozprawę doktorską Pani mgr Karoliny Dobrzyń oceniam pozytywnie. Za najważniejsze jej osiągnięcia uznaję: (1) wykazanie po raz pierwszy ekspresji mRNA dla błonowych receptorów progesteronu PGRMC1, PGRMC2, mPR α , mPR β i mPR γ oraz ich immunlokalizację w tkance endometrium, kosmówki gładkiej i placentomów łożyska krwi w drugim trymestrze ciąży, co wskazuje na możliwość pozagenomowego oddziaływania progesteronu; (2) wykazanie wpływu progesteronu, estradiolu, czynnika martwicy nowotworu α oraz transformującego czynnika wzrostu β na ekspresję jedynie receptorów błonowych typu mPR, co świadczy o złożoności regulacji ekspresji błonowych receptorów progesteronu w komórkach łożyska krwi poprzez hormony i czynniki produkowane w czasie ciąży.

Recenzowana dysertacja stanowi wartościowe dzieło naukowe o znaczącym wkładzie w poszerzenie dotychczasowego stanu wiedzy na temat molekularnych mechanizmów działania progesteronu w łożysku na modelu krwi. Uzyskane wyniki są oryginalne i z pewnością stanowią doskonały punkt wyjścia do dalszych badań. Pragnę zaznaczyć, że przedstawione przeze mnie uwagi i pytania nie umniejszają wartości merytorycznej pracy i wynikają jedynie z ciekawości oraz obowiązku recenzenta.

WNIOSEK KOŃCOWY

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Karoliny Dobrzyń pt. "Regulacja ekspresji błonowych receptorów progesteronu oraz ich funkcja w łożysku krwi" spełnia wszystkie wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882 z późn. zm.) stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym **zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej dyscypliny zootechniki i rybactwo Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Dobrzyń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Guen'ah