



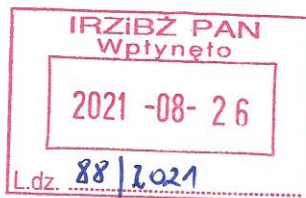
UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT

10-719 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 5, tel. (89) 523 3640, 3405

*dr hab. n. wet. Magdalena Koziorowska-Gilun, prof. UWM
Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie*

Olsztyn dn. 25.08.2021 r.



Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Dobrzyń
pt. „Regulacja ekspresji błonowych receptorów progesteronu oraz ich funkcja w łożysku
krowy”

Badania nad rozrodem zwierząt są przedmiotem zainteresowania wielu zespołów badawczych. Sprawne funkcjonowanie układu rozrodczego samic ssaków podlega złożonemu i powiązanemu ze sobą systemowi regulacji zarówno na poziomie molekularnym, komórkowym jak i narządowym.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy roli progesteronu (P4) w łożysku krowy i wpisuje się w nurt badań Zakładu Fizjologii i Toksykologii Rozrodu. W pracy dokonano weryfikacji postawionej hipotezy badawczej, że P4 uczestniczy w regulacji funkcji łożyska krowy na drodze pozagenomowej poprzez aktywację błonowych receptorów, których ekspresja może być regulowana przez hormony steroidowe, cytokiny i czynniki wzrostu produkowane lokalnie w macicy i łożysku.

Praca doktorska mgr Karoliny Dobrzyń posiada typowy charakter dla tego rodzaju opracowań naukowych. Zawiera 87 stron maszynopisu, w tym 29 rycin, 3 tabele i 213 pozycji piśmiennictwa i podzielona jest na następujące rozdziały: Streszczenie (4 strony- w języku polskim i angielskim), Wykaz skrótów (2 strony), Wstęp (21 stron), Cel i hipoteza badawcza (2 strony) Materiały i metody (11 stron), Wyniki (20 stron), Dyskusja (8 stron), Wnioski (1 strona), Literatura (18 stron).

We **wstępie** dysertacji podzielonym na 3 podrozdziały, Autorka przedstawiła, między innymi, procesy regulacyjne w układzie rozrodczym samicy, bardzo szczegółowo omówiła syntezę i funkcję progesteronu w układzie rozrodczym samicy, scharakteryzowała znane mechanizmy działania progesteronu na komórkę w tym genomowe i pozagenomowe działanie tego hormonu oraz budowę jądrowych i błonowych receptorów progesteronu i progestagenów. W ostatnim podrozdziale scharakteryzowała budowę i funkcję łożyska oraz przedstawiła obecną wiedzę na temat receptorów progesteronu w łożysku. Autorka dodatkowo umieściła w tym rozdziale dwie ryciny obrazujące schemat syntezy hormonów steroidowych i progesteronu



w jajniku (strona 11 i 12 dysertacji), oraz schemat genomowego i pozagenomowego mechanizmu działania P4 (strona 22 dysertacji), co czyni opisywane zagadnienia bardziej przejrzystymi dla czytelnika. W mojej opinii rozdział ten nie budzi zastrzeżeń jasno wprowadzając czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem rozprawy doktorskiej. Rozdział kończy stwierdzenie Doktorantki: „*Biorąc pod uwagę kluczową rolę P4 w zapoczątkowaniu i przebiegu ciąży, poznanie mechanizmów działania P4 w łożysku oraz czynników regulujących te procesy ma istotne znaczenie*”.

Następnie Doktorantka określiła precyzyjnie hipotezę badawczą oraz cel pracy, który realizowała poprzez określenie trzech celów szczegółowych: (a) określenia poziomu ekspresji oraz lokalizacji błonowych receptorów P4; (b) określenia czynników regulujących ekspresję błonowych receptorów P4 oraz (c) zdefiniowania odpowiedzi komórek na P4 zależnie od ich genomowego lub pozagenomowego pobudzenia w łożysku krwi w drugim trymestrze ciąży.

Jedenastostronicowy rozdział **Materiały i metody** obejmuje szczegółowy opis pozyskiwania oraz przygotowania materiału badawczego do badań oraz opis przebiegu doświadczeń, które korespondują z celami badawczymi postawionymi przez Doktorantkę. Zaletą ocenianej pracy jest zastosowanie w niej wielu technik analitycznych z zakresu biologii molekularnej z użyciem nowoczesnej aparatury badawczej. Świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia badań w prezentowanym obszarze nauki. Na uwagę zasługuje fakt, że zastosowany do badań model badawczy skrawków placentomów został opracowany w macierzystym Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu. Pozwoliło to na badanie funkcji łożyska *in vitro* oddając status fizjologiczny tego narządu.

Do statystycznej interpretacji wyników Doktorantka wykorzystała oprogramowanie Statistica Software. Zastosowane testy statystyczne (jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA z użyciem testu post-hoc Duncana testu post-hoc Tukeya) nie budzą zastrzeżeń.

W rozdziale **Wyniki**, Doktorantka w sposób szczegółowy, przedstawiła otrzymane rezultaty, udokumentowane opracowanymi graficznie 18 rycinami z których dwie stanowią zdjęcia preparatów ukazujących lokalizację białek błonowych receptorów progesteronu.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka dokonała analizy uzyskanych wyników badań, odnosząc je do badań innych Autorów. W pierwszej części rozdziału Doktorantka dokonała analizy ekspresji mRNA i analizy immunohistochemicznej błonowych receptorów progesteronu w łożysku krwi. Kolejno odniosła się do wpływu steroidów na ekspresję i regulację ekspresji błonowych receptorów progesteronu oraz omówiła uzyskane rezultaty badań dotyczące wpływu zastosowanych cytokin i czynników wzrostu na regulację ekspresji



blonowych receptorów P4. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością cytowanej literatury przedmiotu, a także umiejętnością jej wykorzystania w zestawieniu z wynikami badań własnych. Niewielki niedosyt budzić mogą jedynie skromne komentarze własne w odniesieniu do interpretacji wyników.

Całość kończy krótkie podsumowanie oraz czytelny schemat podsumowujący uzyskane wyniki. Następnie Doktorantka zaprezentowała 6 wniosków jako oddzielny rozdział.

Rozdział **Literatura** obejmuje 213 pozycji ułożonych alfabetycznie, z czego niemal wszystkie są anglojęzyczne.

Bardzo wysoko oceniam pracę zarówno pod względem metodycznym, jak i merytorycznym, jednak mam kilka pytań i uwag:

1. W rozdziale **Materiał i metody** w opisie pozyskiwania materiału badawczego Doktorantka wskazała, że miesiąc ciąży określała na podstawie cech morfologicznych łożyska i płodu oraz korzystając ze wzoru Kellera. W mojej opinii wskazane byłoby wykazanie obliczeń wynikających z tego wzoru. Jako, że wzór w pierwotnej formie służy do wyliczenia długości płodu słusznym byłoby pokazać jak został on przekształcony i jak wyliczana była długość ciąży, gdzie daną wiadomą była długość płodu.
2. Również w rozdziale **Materiał i metody**, Doktorantka opisując sposób preparacji skrawków placentomów, ednometrium i kosmówki gładkiej posługuje się zróżnicowanymi jednostkami miar (cm, mm, g) w stosunku do uzyskanych tkanek. Czy wynika to ze specyfiki pozyskiwanych skrawków tkanek? Jeśli tak należałoby o tym wspomnieć.
3. W rozdziale **Wyniki** na stronie 43 Autorka na ryc. 10 prezentuje poziom ekspresji blonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy. Zauważyłam pewne rozbieżności pomiędzy rycinami a opisem w tekście. Cyt: „Zaobserwowano wyższą ekspresję mRNA PGRMC1 i PGRMC2, w porównaniu do receptorów mPR we wszystkich badanych tkankach”. Jednak na rycinie 10 (C) nie wykazano różnic pomiędzy PGRMC2, a mPR α . Ponadto Autorka wskazuje na najwyższą ekspresję mPR β w placentomach ($p < 0,05$) spośród badanych receptorów mPR. Na wykresie jednak poziomy ekspresji mPR β w placentomach nie różniły się w porównaniu do poziomu ekspresji mPR γ 10 (C). Sugerowałabym również na wykresach umieścić informację jakiej tkanki łożyska dotyczą. A także na kolejnych wykresach uwidocznąć czas



- inkubacji 6 i 24 h. Ułatwiłoby to odczytywanie wyników bez konieczności spoglądania w opis pod wykresem.
4. W rozdziale **Dyskusja** pierwsze 2 akapity są w zasadzie tożsame i mówią o wykazaniu ekspresji błonowych receptorów P4 w łożysku krowy w drugim trymestrze ciąży. Moją sugestią jest przeredagowanie tej części rozdziału.
 5. O ile podsumowanie nie budzi zastrzeżeń, to w mojej ocenie prezentowane wnioski z wyjątkiem wniosku 4 cyt: „**Progesteron i estradiol regulują ekspresję genów błonowych receptorów mPR w placentomach łożyska krowy w drugim trymestrze ciąży, przy czym progesteron może regulować ekspresję mPR β i mPR γ zarówno na drodze genomowej i pozagenomowej**” są w zasadzie skróconym opisem uzyskanych wyników. np.: wniosek 5 cyt: „**Czynnik martwicy nowotworu α stymuluje ekspresję genu błonowego receptora mPR α w placentomach łożyska krowy w drugim trymestrze ciąży**”. To zostało stwierdzone w rozdziale Wyniki (strona 56 dysertacji). Według mnie przed przygotowaniem pracy do druku wnioski powinny zostać przeredagowane z uwzględnieniem tego, że nie powinny być one powtórzeniem uzyskanych wyników, a uogólnieniami z przeprowadzonej dyskusji.
 6. Ostatnia uwaga dotyczy rozdziału **Literatura**.
 - Pozycja 33 literatury w tekście dysertacji powinna być zmieniona na Conneely 2001.
 - W literaturze brakuje pozycji Day 1977 cytowanej na stronie 27 dysertacji.
 - Pozycja 100 literatury powinna w tekście zostać wpisana jako Leidl i wsp., 1980.

Przedstawione uwagi mają raczej charakter redakcyjny i dyskusyjny, nie umniejszając wysokiej wartości merytorycznej ocenianej pracy.



UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT

10-719 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 5, tel. (89) 523 3640, 3405

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Karoliny Dobrzyń merytorycznie mieści się w obszarze dziedzin nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Praca ta ma przede wszystkim znaczenie poznawcze i wskazuje na złożoność procesów regulujących wpływ różnych czynników na ekspresję błonowych receptorów P4 w łożysku krowy. Przedstawiona rozprawa doktorska nie tylko dostarcza nowej wiedzy w zakresie rozrodu krów ale również zachęca do podjęcia dalszych badań nad mechanizmami regulującymi procesy zachodzące w układzie rozrodczym samicy podczas trwania ciąży.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska **Pani mgr Karoliny Dobrzyń pt. „Regulacja ekspresji błonowych receptorów progesteronu oraz ich funkcja w łożysku krowy”** spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim zawarte w przepisach (art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.), zwana dalej ustawą, w zw. z art. 179 ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. Z 2018 r. poz. 1669 ze zm.).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie o przyjęcie pracy i dopuszczenie **Pani mgr Karoliny Dobrzyń** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Magdalena Koziorowska-Gilun