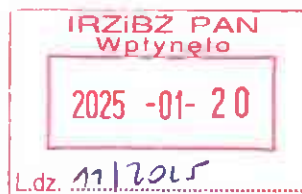




UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Biotechnologii Zwierząt

Prof. dr hab. Dorota A. Zięba-Przybylska
Tel. 12 429 72 24
Kom. [REDACTED]
Fax: 12 429 75 47
e-mail: dorota.zieba-przybylska@urk.edu.pl



OCENA

PRACY DOKTORSKIEJ MGR MONIKI MAGDALENY BARYŁA

wykonanej w Zespole Mechanizmów Działania Hormonów

Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
pod opieką naukową Pani prof. dr hab. Agnieszki Waclawik i promotora pomocniczego
dr Piotra Kaczyńskiego

nt.:

**ZNACZENIE PROKINETYCYN 1 W PROCESACH ZWIĄZANYCH Z FUNKCJĄ CIAŁKA
ŻÓŁTEGO PODCZAS WCZESNEJ CIĄŻY I CYKLU RUJOWEGO U ŚWINI DOMOWEJ
(*SUS SCROFA DOMESTICA* L.)**

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie podjęty w dniu 12 grudnia 2024 r.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Moniki Magdaleny Baryła nt. "Znaczenie prokinetycyny 1 w procesach związanych z funkcją ciała żółtego podczas wczesnej ciąży i cyklu rujowego u świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)" została wykonana w Zespole Mechanizmów Działania Hormonów Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, pod opieką naukową Pani prof. dr hab. Agnieszki Waclawik i promotora pomocniczego pana dr Piotra Kaczyńskiego. Praca doktorska została zrealizowana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki Preludium-18 (2019/35/N/NZX9/03986) oraz ze środków IRZiBŻ PAN w Olsztynie w ramach Funduszu Badań Własnych (18/FBW/2021).

Wyniki przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej zostały opublikowane w dwóch spójnie tematycznych pracach oryginalnych, w czasopismach indeksowanych przez ISI Web of Science tj. w Scientific Reports (IF = 3,8; 140 pkt. MEIN) i Theriogenology (IF = 2,4; 140 pkt. MEIN). Praca doktorska zgodnie z Uchwałą nr 2 Rady Naukowej IRZiBŻ PAN w Olsztynie z dnia 3 grudnia 2013 roku – wytyczne Rady Naukowej IRZiBŻ w Olsztynie w

sprawie przygotowania rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów – opatrzona jest załącznikami: syntetycznym komentarzem liczącym 51 stron tekstu zawierającym: Streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, Spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, Wstęp, Hipotezę badawczą, Cel badań, Zadania badawcze, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i Wnioski, Piśmiennictwo, Oświadczenia współautorów o procentowym wkładzie poszczególnych osób w przygotowanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz opublikowane 2 prace oryginalne. Zatem, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wszystkie wymogi zamieszczone w Załączniku nr 2 do protokołu 9. posiedzenia Rady Naukowej w dniu 3 grudnia 2013 r.

Magister Monika M. Baryła opublikowała wyniki w dwóch oryginalnych pracach badawczych:

1. Baryła M., Goryszewska-Szczurek E., Kaczyński P., Balboni G., Wacławik A. 2023. Prokinectin 1 is a novel factor regulating porcine corpus luteum function. *Scientific Reports*, 13(1):5085. DOI:10.1038/s41598-023-32132-3.
2. Baryła M., Kaczyński P., Goryszewska-Szczurek E., Wacławik A. 2024. The regulation of the expression of prokinectin 1 and its receptors and its mechanism of action in the porcine corpus luteum. *Theriogenology*, 226:39-48. DOI: 10.1016/j.theriogenology. 2024.05.044

Prace te są pracami zespołowymi, w których Autorka jest pierwszym autorem z indywidualnym, procentowym udziałem merytorycznym w opracowanie koncepcji, pracę laboratoryjną, analizę i interpretację wyników, zdobywaniem funduszy na badania, opracowaniem pierwotnej i końcowej wersji manuskryptu wynoszącym odpowiednio 50 dla pierwszej publikacji i 55 dla drugiej publikacji. Współautorstwo to jest w pełni zrozumiałe biorąc pod uwagę ogrom przeprowadzonej pracy z zastosowaniem metod *ex vivo*, *in vivo*, *in vitro* i innych; oceniam zatem wkład merytoryczny Autorki w opublikowane prace jako znaczący.

Tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej wpisuje się w zakres badań prowadzonych przez promotor rozprawy panią profesor Agnieszkę Wacławik obejmujących mechanizmy zachodzące w procesie macicznego rozpoznania ciąży, implantacji zarodka i rozwoju łożyska z udziałem prostaglandyn, estradiolu i prokinetycyny 1. Przedstawiona do recenzji praca doktorska poszerza wiedzę dotyczącą roli prokinetycyny 1 i jej receptorów w funkcji ciała żółtego świni w okresie wczesnej ciąży i cyklu rujowego.

Autorka stawia hipotezę, że prokinetycyna 1 bierze udział w regulacji funkcjonowania ciała żółtego świni domowej w okresie wczesnej ciąży (dzień 9, 12 i 14) i cyklu rujowego (dzień 9, 12 i 14), taki też jest cel badawczy podjęty został w pracy doktorskiej.

By udowodnić hipotezę i zrealizować cel badawczy magister M. Baryła wyznaczyła sobie 7 zadań badawczych, które konsekwentnie wykonywała, a które opisała w przedstawionych 2 oryginalnych pracach badawczych. Wyniki z realizacji zadania 1, 2, 4, 5, części 6 i 7 stały się podstawą opublikowania pracy w *Scientific Reports*, natomiast wyniki przeprowadzonych badań z zadania 3 i części 6 zostały opisane w pracy opublikowanej w *Theriogenology*.

Dla realizacji założonych zadań badawczych Autorka wykorzystwała wiele zaawansowanych technik badawczych w tym:

- analizę ekspresji genów – w zadaniach 1, 3, 4 i 6;
- analizę ekspresji białek – w zadaniach 1 i 3;
- hodowle in vitro ultracienkich eksplantów ciałek żółtych – w zadaniach od 3 do 6;
- testy immunoenzymatyczne – w zadaniu 4;
- radioimmunologiczne oznaczenie VEGFA i progesteronu – w zadaniu 5;
- cytometrię przepływową – w zadaniu 5;
- test żywotności Alamar Blue – w zadaniu 5;
- hodowle in vitro komórek endotelialnych i komórek śródbłonna naczyń krwionośnych – w zadaniu 6;
- test tworzenia się struktur kapilaropodobnych – w zadaniu 6.

Do badań magister M. Baryła wykorzystwała pozyskane od loch ciałka żółte ciążowe – z wczesnych etapów ciąży (okres rozpoznania ciąży – faza migracji zarodków i implantacji) i pochodzące ze środkowej i późnolutealnej fazy cyklu rujowego. Ciałka żółte pobrano w dniach istotnych dla funkcji tego gruczołu dokrewnego – dzień 9 i 12 cyklu to w pełni funkcjonalne ciałko żółte, dzień 14 to początek luteolizy, natomiast ciałko żółte ciążowe w dniu 9 ciąży to okres migracji zarodków, a 12 dzień ciąży to bardzo ważny okres rozpoznawania macicznego ciąży i dzień 14 początek implantacji zarodków. Chciałabym podkreślić fakt bardzo dobrego doboru dni cyklu rujowego i ciąży dla zbadania roli prokinetocyny 1 w funkcjonowaniu ciałek żółtych. Chciałabym pochwalić także wprowadzenie do komentarza rycin (schematy doświadczeń ex vivo, in vitro) ułatwiających szybkie zrozumienie kiedy i w jakim celu ciałka żółte były pozyskiwane dla realizacji poszczególnych zadań badawczych.

Pani mgr Monika Baryła przeprowadziła doświadczenia ex vivo, w których badała profil ekspresji mRNA i białka dla prokinetocyny 1 i jej receptorów PROKR1 i PROKR2 w ciałkach żółtych pochodzących z dni: 9, 12 i 14 cyklu i ciąży. Następnie na pozyskanych ciałkach żółtych w dniach 12 i 14 dniach cyklu i ciąży przeprowadziła immunolokalizację prokinetocyny 1 i PROKR1 i PROKR2.

Badania in vivo Autorka przeprowadziła, by określić wpływ sygnałów zarodkowych w tym: estradiolu i PGE_2 na ekspresję mRNA (Real-time PCR) i białka prokinetocyny 1 (ELISA) i jej receptorów R1 i R2 (Western blot). Na szczególne podkreślenie zasługuje tutaj procedura wprowadzenia kaniuli do obu rogów macicy w celu 6-krotnej infuzji E_2 i PGE_2 .

W kolejnym doświadczeniu magister M. Baryła podjęła się określenia wpływu czynnika luteolitycznego $PGF_{2\alpha}$ na ekspresję mRNA prokinetocyny 1 i jej receptorów R1 i R2 w ciałkach żółtych pozyskanych w 12 i 14 dniu fazy lutealnej i ciąży. Z tych samych dni pochodziły ciałka żółte na których określono wpływ prokinetocyny 1 na szlak steroidogenezy (ekspresja genów *STAR*, *HSD3B1*, *CYP11A1*) i wydzielanie progesteronu.

Bardzo interesującym jest doświadczenie in vitro w którym Autorka określiła wpływ prokinetocyny 1 na angiogenezę (Real-time PCR, ELISA) wykorzystując hodowlę komórek

endotelialnych i ultracienkie skrawki ciałek żółtych pozyskanych w 12 dniu cyklu. Autorka zbadała wpływ prokinetocyny 1 na ekspresję genów związanych z angiogenezą w tym: *ANG*, *ANGPT2*, *FGF2*, *FTL1*, *KDR* oraz określiła wpływ prokinetocyny 1 na sekrecję VEGFA przez komórki do medium hodowlanego. W kolejnym doświadczeniu z tego samego dnia cyklu pochodziły komórki śródbłonna naczyń krwionośnych ciała żółtego pozyskane by przeprowadzić obserwację formowania się pod wpływem prokinetocyny 1 struktur kapilaropodobnych wykorzystując do tego nakładkę Angiogenesis Analyzer dla programu Image J.

Cytometria przepływowa została wykorzystana przez Autorkę do zbadania żywotności komórek lutealnych pozyskanych w 12 dniu cyklu rujowego.

Jestem pod bardzo silnym wrażeniem przeprowadzonych badań, zastosowanych tak licznych technik badawczych, otrzymanych wyników i dojrzałej dyskusji z wynikami innych badaczy.

Posługując się szerokim wachlarzem metod Autorka wykazała, że prokinetocyna 1 i jej receptor PROKR1 pełnią istotną rolę w funkcjonowaniu ciała żółtego w cyklu i ciąży u świni domowej. Wyniki badań wskazują, że prokinetocyna 1 jest syntetyzowana i wydzielana w ciałku żółtym świni głównie z środkowej fazy lutealnej cyklu rujowego i podczas wczesnej ciąży, jest czynnikiem zaangażowanym w syntezę progesteronu, angiogenezę, apoptozę komórek lutealnych, ponadto prokinetocyna 1 stymuluje żywotność komórek i tkanki lutealnej.

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Moniki Baryła stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe. Starannie przemyślana, a następnie konsekwentnie zrealizowana koncepcja pracy, oparta została na nowoczesnych analizach, badaniach na nowatorskim modelu *in vitro* – inkubacji komórek śródbłonna naczyń w celu oceny formowania się struktur kapilaropodobnych, czy badań *in vivo* w tym infuzji czynników do rogów macicy, co pozwoliło na obiektywną i krytyczną ocenę problemów postawionych w celu pracy i poszczególnych zadaniach badawczych.

Dysertacja świadczy o dużej biegłości Doktorantki w poruszanej przez Nią tematyce odnoszącej się do określenia roli prokinetocyny 1 i jej receptorów w funkcjonowaniu ciała żółtego świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży. Umiejętność krytycznej dyskusji otrzymanych wyników świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

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

W ocenianej rozprawie doktorskiej trudno zresztą jest wskazać uwagi krytyczne.

KONKLUZJA

Rozprawę doktorską nt. "Znaczenie prokinetocyny 1 w procesach związanych z funkcją ciała żółtego podczas wczesnej ciąży i cyklu rujowego u świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)" 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. "Znaczenie prokinetycyny 1 w procesach związanych z funkcją ciała żółtego podczas wczesnej ciąży i cyklu rujowego u świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)" i indywidualny wkład Doktorantki spełniają wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r., poz.1571) i pozytywnie opiniuję rozprawę doktorską.

Zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki M. Baryła i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie pani Monice Baryła stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Wnioskuje także, do Rady Naukowej IRZiBŻ PAN w Olsztynie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr Moniki Baryła. Rozprawa doktorska charakteryzuje się wyjątkowymi aspektami poznawczymi wykraczającymi poza dyscyplinę zootechnika i rybactwo. Przedstawione wyniki wskazują na mechanizm działania prokinetycyny 1 i jej receptorów w funkcjonowaniu ciała żółtego w cyklu rujowym i w okresie wczesnej ciąży.

Praca wnosi nową wiedzę o działaniu tego ważnego gruczołu dokrewnego, w szczególnym okresie – wczesnej ciąży, kiedy dochodzi do rozpoznawania macicznego ciąży i implantacji zarodka, a także okresu pełnej jego pracy w środkowej fazie cyklu rujowego. Wyniki te można śmiało odnieść nie tylko do świni, ale i innych gatunków. Praca wyróżnia się oryginalnością metod badawczych i ich wysokim opanowaniem przez Doktorantkę, o czym świadczą oświadczenia pozostałych autorów publikacji.

Kraków, 12 stycznia 2025 roku

 Signed by /
Podpisane przez:
¹Dorota Anna
Zięba-Przybylska
Date / Data:
2025-01-12 13:49
prof. dr hab. Dorota Zięba-Przybylska