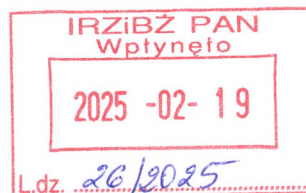


Prof. dr hab. Nina Smolińska
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
10-718 Olsztyn
Ul. Oczapowskiego 1A



**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Moniki Magdaleny Baryły
pt. „Znaczenie prokinetycyny 1 w procesach związanych
z funkcją ciała żółtego podczas wczesnej ciąży i cyklu rujowego
u świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)”**

**wykonanej pod kierunkiem
prof. dr hab. Agnieszki Wacławik oraz dr. Piotra Kaczyńskiego
w Zespole Mechanizmów Działania Hormonów
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Oceniana rozprawa doktorska składa się z dwóch oryginalnych publikacji – niżej wyszczególnionych – opublikowanych w języku angielskim w renomowanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports*, których wskaźniki naukometryczne są wysokie. Łączny wskaźnik *IF* z roku opublikowania wynosi **6,2** a liczba punktów wg Komunikatu Ministra Nauki z dnia 5 stycznia 2024 r. wynosi **280**.

1. **BARYŁA M.**, GORYSZEWSKA-SZCZUREK E., KACZYŃSKI P., BALBONI G., WACŁAWIK A. 2023. Prokineticin 1 is a novel factor regulating porcine corpus luteum function. *Scientific Reports*, 13(1): 5085. DOI: 10.1038/s41598-023-32132-3. (**IF – 3,8; pkt. MNiSW – 140**)
2. **BARYŁA M.**, KACZYŃSKI P., GORYSZEWSKA-SZCZUREK E., WACŁAWIK A. 2024. The regulation of the expression of prokineticin 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. (**IF – 2,4; pkt. MNiSW – 140**)

Publikacje są współautorskie (od 4 do 5 autorów) przy czym Doktorantka jest w nich pierwszym autorem. Autorem korespondencyjnym w obydwu publikacjach jest Pani Promotor, prof. dr hab. Agnieszka Waclawik. Z przedłożonych oświadczeń współautorów wynika, że Pani mgr Monika Baryła pełniła wiodącą rolę w powstawaniu tych publikacji. Jej indywidualny udział w powstaniu publikacji jest szacowany na 50 oraz 55% i nie budzi wątpliwości. Zbiór publikacji stanowiących zasadniczą część rozprawy doktorskiej uzupełniony jest polskojęzycznym opracowaniem, w skład którego wchodzi: spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp, hipoteza, cel, zadania badawcze, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, piśmiennictwo (63 pozycje) oraz oświadczenia współautorów. Doktorantka opracowała przejrzyste schematy, które w pełni oddają istotę realizowanych zadań badawczych. Na uznanie zasługuje fakt, że, prezentowane wyniki badań uzyskano dzięki realizacji projektu badawczego, którego kierownikiem jest Doktorantka (*PRELUDIUM 18, 2019/35/N/NZ9/03986*), finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Pod względem formalnym oceniana rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane tego typu opracowaniom.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Tematem badawczym podjętym w ramach rozprawy doktorskiej było określenie roli prokinetycyny 1 (PROK1) w procesach związanych z funkcjonowaniem ciała żółtego (CL) świni domowej w okresie wczesnej ciąży i cyklu rujowego. Ciało żółte pełni kluczową rolę w wydzielaniu progesteronu (P4), który jest niezbędny do zapoczątkowania i utrzymania ciąży. Prawidłowa struktura i funkcja CL determinują potencjał rozrodczy zwierząt, a wszelkie zaburzenia w tym obszarze mogą go istotnie osłabić. Liczne doniesienia naukowe potwierdzają, że zdolności rozrodcze człowieka i zwierząt gospodarskich ulegają pogorszeniu. Nie dziwi zatem fakt, że od wielu lat naukowcy podejmują próbę wyjaśniania mechanizmów regulujących funkcjonowanie CL, szczególnie w okresie wczesnej ciąży, kiedy ryzyko utraty zarodków jest wysokie. Warto podkreślić również trafność wyboru modelu badawczego zastosowanego w doświadczeniach. Świnia domowa jest nie tylko gatunkiem o dużym znaczeniu ekonomicznym, ale również doskonałym modelem eksperymentalnym do badania określonych mechanizmów i procesów fizjologicznych oraz patofizjologicznych człowieka.

Ze względu na swoją kluczową rolę w procesie angiogenezy, PROK1 jest również określana jako czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego zależnego od gruczołów dokrewnych (EG-VEGF). Wykazano, że peptyd ten odgrywa istotną rolę w procesach rozrodczych samic, szczególnie w fizjologii jajników, receptywności błony śluzowej macicy, a nawet w implantacji. Badania sugerują, że PROK1 może być kluczowym mediatorem procesów niezbędnych do ustanowienia i prawidłowego rozwoju ciąży. Poznanie i zrozumienie roli czynników warunkujących funkcjonowanie CL może w przyszłości przyczynić się do

poszerzenia możliwości terapeutycznych wspierających prawidłowy przebieg ciąży. Tematykę badawczą ocenianej rozprawy doktorskiej uważam za interesującą i aktualną, a podjęcie badań w tym zakresie za w pełni uzasadnione. O istotności i nowatorskim charakterze badań w tym zakresie może również świadczyć fakt uzyskania bardzo wysokiej ich oceny, a co z tym idzie – finansowania przez NCN na ich prowadzenie w ramach wymienionego wcześniej projektu. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktoranta w polskojęzycznym opracowaniu rzetelnie i precyzyjnie wskazała, co już zostało zbadane, a co stanowi nowość w jej rozprawie doktorskiej.

Hipoteza badawcza rozprawy doktorskiej zakładała, że PROK1 bierze udział w regulacji funkcjonowania CL świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie wczesnej ciąży oraz podczas cyklu rujowego. W celu jej weryfikacji określono profile ekspresji genów i białek PROK1 oraz jej receptorów w CL w czasie cyklu rujowego i we wczesnej ciąży, a także lokalizację białek PROK1 i jej receptorów w CL. Zbadano wpływ sygnałów zarodkowych (estradiolu - E2, prostaglandyny E2 - PGE2) oraz czynnika luteolitycznego (prostaglandyny F2 α - PGF2 α) na ekspresję genów i białek PROK1 oraz jej receptorów w CL *in vitro* i *in vivo*. Określono wpływ PROK1 na ekspresję genów czynników zaangażowanych w szlak steroidogeny oraz na uwalnianie P4 przez CL. Ponadto zbadano wpływ PROK1 na żywotność tkanki CL, apoptozę komórek lutealnych oraz proces angiogenezy w CL. Należy podkreślić, że oceniane prace są spójne pod względem tematycznym i metodycznym oraz wartościowe pod względem poznawczym. Pozytywnie oceniam uzasadnienie podjęcia badań, postawioną hipotezę badawczą i sformułowany cel badań. W mojej opinii cel został w pełni zrealizowany. Zakres stosowanych metod i analiz laboratoryjnych jest szeroki, co wskazuje na duże umiejętności Doktorantki i bogaty warsztat eksperymentalny. Wykorzystano w niej wiele technik m.in. izolacje RNA i białek, real-time PCR, elektroforezę SDS-PAGE, Western blot, immunohistochemię, hodowle *in vitro* eksplantatów CL, hodowle *in vitro* komórki lutealnych oraz komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, test radioimmunologiczny, test immunoenzymatyczny, cytometrię przepływową, test żywotności tkanek z użyciem Alamar Blue, test funkcjonalny tworzenia się struktur kapilaropodobnych oraz test proliferacji komórek. Zastosowane analizy laboratoryjne są właściwie dobrane do założonego celu badawczego. Chciałabym zaznaczyć, że powyższe techniki wymagały ogromnego nakładu pracy, co zasługuje na uznanie.

Doktorantka wykazała obecność genów i białek PROK1 oraz jej receptorów w CL świni, a profile ich ekspresji zmieniały się w zależności od dnia cyklu i ciąży. Potwierdzono lokalizację białka PROK1 i jej receptorów w komórkach steroidogennych oraz naczyniach krwionośnych CL. Za szczególnie istotne należy uznać wyniki uzyskane zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, które wykazały, że E2 i PGE2 - hormony wydzielane m.in. przez rozwijające się zarodki - stymulują ekspresję PROK1 oraz jej receptora PROKR1 w CL świni. Wyniki te wskazują na istotną rolę PROK1 w mechanizmach zabezpieczających CL przed

luteolizą. Ponadto stwierdzono stymulujący wpływ $\text{PGF}_{2\alpha}$ na ekspresję genu PROK1 w CL świni w 12. i 14. dniu cyklu rujowego, co sugeruje jej potencjalną rolę w procesie luteolizy. Szczególnie interesujące i wartościowe są również wyniki wskazujące, że PROK1 reguluje kluczowe procesy związane z funkcjonowaniem CL, takie jak steroidogeneza, apoptoza, proliferacja i angiogeneza. Wykazano, że PROK1 pobudza syntezę P4 w CL w 12. dniu ciąży m. in. poprzez wpływ na ekspresję genów czynników zaangażowanych w steroidogenezę (*HSD3B1*, *STAR* i *CYP11A1*). Ponadto PROK1 hamuje apoptozę komórek lutealnych świni oraz zwiększa ich żywotność. Wykazano również, że PROK1 stymuluje angiogenezę zarówno bezpośrednio, poprzez zwiększenie proliferacji komórek śródbłonka i tworzenie struktur kapilarnych w ciałku żółtym, jak i pośrednio, poprzez modulację czynników angiogennych. Dodatkowo stwierdzono, że PROK1 może pobudzać angiogenezę poprzez aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych, takich jak kinaza białkowa aktywowana mitogenami (MAPK), kinaza białkowa B (AKT) i kinaza białkowa treoninowo-serynowa (mTOR). Uzyskane wyniki potwierdzają, że PROK1 pełni istotną rolę w regulacji funkcji CL świni zarówno w fazie środkowo-lutealnej cyklu rujowego, jak i we wczesnej ciąży.

Doktorantka, pomimo uzyskania licznych wyników, zaprezentowała je bardzo starannie i logicznie. Dokumentacja graficzna wyników w postaci rycin, zdjęć i tabel jest czytelna i przejrzysta. Doktorantka wykazała się również umiejętnością wnikliwej analizy i interpretacji prezentowanych wyników w świetle aktualnej literatury. Moim zdaniem dyskusja wyników w pracach oryginalnych i polskojęzycznym opracowaniu jest wszechstronna i wyczerpująca. W pracach oryginalnych i polskojęzycznym opracowaniu Doktorantka trafnie i syntetycznie podsumowuje uzyskane wyniki. Po analizie tej części rozprawy stwierdzam, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę są oryginalne, interesujące i mają dużą wartość naukową. Oceniana rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w rozwój dyscypliny zootechnika i rybactwo. Problemy z płodnością stają się coraz powszechniejsze i dotyczą zarówno ludzi, jak i zwierząt, dlatego konieczne są dalsze badania, które umożliwią rozwój skutecznych terapii wspierających płodność i prawidłowy przebieg ciąży.

SUGESTIE, UWAGI I PYTANIA

Po analizie ocenianej rozprawy doktorskiej nasunęły mi się następujące uwagi, sugestie i pytania:

1. Proszę o wyjaśnienie celu porównywania profili ekspresji genów i białek PROK1 oraz jej receptorów w CL pomiędzy wszystkimi badanymi dniami cyklu i ciąży?
2. Wątpliwości budzą bloty dotyczące ekspresji białka referencyjnego, dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) przedstawione w publikacji nr 1 na rycinie 1D (dzień 9) i na rycinie 1F oraz w publikacji nr 2 na rycinie 3F. Przedstawione bloty sugerują zmienną ekspresję białka pomiędzy badanymi próbami, co w przypadku białka referencyjnego nie powinno mieć miejsca. Mam świadomość, że nie należy rozważać

różnic w ekspresji białek, opierając się wyłącznie na reprezentatywnych blotach. Dlatego też, warto byłoby wykonać analizy statystyczne uwzględniające ekspresję tego białka i przedstawić wyniki.

3. W pracy wykazano, że PROK1 stymuluje syntezę P4 przez eksplantaty CL m. in. poprzez wpływ na ekspresję genów czynników uczestniczących w procesie steroidogenezy: *STAR*, *HSD3B1* oraz *CYP11A1*. Cennym uzupełnieniem wyników byłyby analiza ekspresji białek i aktywności enzymów zaangażowanych w proces steroidogenezy oraz identyfikacja wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Czy tego rodzaju badania są planowane?
4. Aby uzupełnić wyniki uzyskane metodą cytometrii przepływowej, warto byłoby określić aktywność kaspazy-3 (efektorowej proteazy apoptozy), a także kaspazy-8 i kaspazy-9 (kaspaz inicjatorowych). Analiza ta pozwoliłaby jednoznacznie potwierdzić aktywację procesu apoptozy oraz określić, który ze szlaków – zewnętrzny (kaspaza-8) czy wewnętrzny (kaspaza-9) – jest dominujący w badanym modelu. Wyniki dostarczyłyby kluczowych informacji o mechanizmie śmierci komórkowej i zwiększyły wartość naukową badań.
5. W pracy wykazano bezpośredni i pośredni wpływ PROK1 na proces angiogenezy w CL świni. Nie stwierdzono jednak wpływu PROK1 na ekspresję genów angiopoetyny 2 (*ANGPT2*), czynnika wzrostu fibroblastów 2 (*FGF2*), receptora 1 (*FLT1*) oraz receptora 2 (*KDR*) dla czynnika wzrostu śródbłónka naczyń krwionośnych. Proszę o sugestie dotyczące możliwych przyczyn tego zjawiska. Czy rozważano analizę ekspresji białek tych czynników?
6. Czy sprawdzono normalność rozkładu danych? Jeśli tak, to jaką metodą? W publikacjach oraz w polskojęzycznym opracowaniu nie podano na ten temat informacji.
7. W polskojęzycznym opracowaniu brakuje informacji o temperaturze przyłączania starterów w opisie metody real-time PCR.
8. Proszę o uzupełnienie informacji dotyczącej procentowości żeli Tris-Tricine SDS-PAGE.
9. W publikacji nr 1, w podpisach pod rycinami nr 4 i 7, brakuje wskazania wartości p.
10. W publikacji nr 1, na rycinie 7, nie znalazłam wyników dotyczących braku wpływu PROK1 na ekspresję genów *ANGPT2*, *FGF2*, *FLT1* oraz *KDR*, co wskazano na stronie 32 polskojęzycznego opracowania.
11. W publikacji nr 1, w opisie wyników eksperymentu 4, znajduje się zdanie dotyczące stymulującego wpływu PROK1 na proces apoptozy: „These stimulating effects of PROK1 on apoptosis and the viability of luteal cells were diminished using PROK1 antagonist (PC7).” Jednak uzyskane wyniki wskazują, że PROK1 hamuje proces apoptozy komórek lutealnych, co opisano wcześniej w tym samym akapicie. Zdanie to wymaga korekty.
12. W publikacji nr 1 brakuje informacji o współczynnikach zmienności (wewnętrznej i międzyseryjnych) dla analizy sekrecji czynnika wzrostu śródbłónka naczyń krwionośnych typu A (VEGFA) metodą ELISA.

13. W publikacji nr 2, w opisie ryciny 4, wskazano, że istotnie różnice statystycznie oznaczono literami od a-c, jednak na rycinie widnieją tylko a i b.

PODSUMOWANIE

Reasumując, rozprawę doktorską Pani mgr Moniki Baryły oceniam bardzo wysoko. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki dostarczają nowych danych, które są cennym uzupełnieniem badań zmierzających do przezwyciężania problemów związanych z niepłodnością, a także mogą stanowić podstawę do prowadzenia kolejnych eksperymentów. Dwie oryginalne prace, będące podstawą rozprawy doktorskiej, są rzetelnie przygotowane, zawierają jasno określony cel, staranny opis przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych wyników oraz wnikliwą i dojrzałą dyskusję. Na podkreślenie zasługuje istotna tematyka rozprawy doktorskiej, szeroki zakres prowadzonych badań oraz kompleksowe podejście do rozpatrywanego problemu. Doktorantka wykazała się doskonałym przygotowaniem merytorycznym oraz umiejętnością posługiwania się różnorodnymi metodami badawczymi. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można stwierdzić, że Doktorantka zdobyła niezbędne doświadczenie i umiejętności przydatne w przyszłej pracy badawczej. Należy również docenić jej dorobek naukowy, obejmujący dwanaście publikacji (według bazy *Web of Science Core Collection* ilość cytowań (bez autocytowań) wynosi 119, a indeks *H* – 9). Zawarte w mojej recenzji uwagi, sugestie oraz pytania nie podważają wysokiej wartości zaprezentowanych wyników, lecz mają na celu wzbogacenie naukowej dyskusji. Mam również nadzieję, że zostaną wykorzystane w przygotowaniu kolejnych publikacji oraz w przyszłej pracy naukowej.

WNIOSEK KOŃCOWY

W moim przekonaniu, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. *„Znaczenie prokinetycyny 1 w procesach związanych z funkcją ciała żółtego podczas wczesnej ciąży i cyklu rujowego u świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)”* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wszystkie wymagania – określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) stawiane rozprawom doktorskim. Na tej podstawie zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Moniki Baryły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy zaprezentowanych wyników badań oraz ich oryginalny charakter, co znajduje odzwierciedlenie w opublikowaniu ich w czasopismach o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy.

Olsztyn, 17 lutego 2025 r.

Z poważaniem