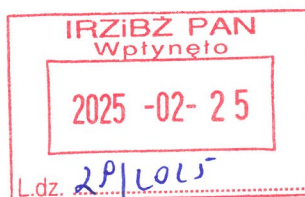




Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
ul. Wołyńska 33
60-637 Poznań
tel. +48 61 848 71 87
e-mail: genetyka@up.poznan.pl

WYDZIAŁ MEDYCYNY
WETERYNARYJNEJ I
NAUK O ZWIERZĘTACH
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt



Dr hab. Piotr Pawlak

14.02.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Baryły
wykonanej w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie
pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Waclawik oraz dr Piotra Kaczyńskiego (promotor pomocniczy)

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Znaczenie prokinetyny 1 w procesach związanych z funkcją ciała żółtego podczas wczesnej ciąży i cyklu rujowego u świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)” to zwięzłe opracowanie w oparciu o dwie spójne tematycznie prace oryginalne, opublikowane w 2023 i 2024 roku w rozpoznawalnych czasopismach międzynarodowych o dobrych wskaźnikach (wskazane poniżej). Praca doktorska powstała dzięki finansowaniu projektu NCN Preludium (2019/35/N/NZ9/03986) oraz Funduszy Instytutu.

- 1) Baryła M, Kaczynski P, Goryszewska-Szczurek E, Waclawik A. The regulation of the expression of prokineticin 1 and its receptors and its mechanism of action in the porcine corpus luteum. *Theriogenology*. 2024 Sep 15;226:39-48. doi: 10.1016/j.theriogenology.2024.05.044.
- 2) Baryła M, Goryszewska-Szczurek E, Kaczynski P, Balboni G, Waclawik A. Prokineticin 1 is a novel factor regulating porcine corpus luteum function. *Sci Rep*. 2023 Mar 29;13(1):5085. doi: 10.1038/s41598-023-32132-3.

Praca została wykonana zgodnie z wymogami stawianymi przez Instytut. Autorka rozprawy zawarła stosowne oświadczenia o wkładzie merytorycznym współautorów w powstanie publikacji. Jasno wynika z nich, że doktorantka pełniła wiodącą rolę badawczą (50 i 55%), co zostało także zawarte szczegółowo w opublikowanych pracach (od wykonania badań po pisanie prac oraz odpowiedzi na recenzje). Rozprawa liczy łącznie 50 stron, a składają się na nią rozdziały: streszczenie w języku ojczystym i angielskim, wstęp, opis hipotezy i celów badawczych, materiał i metody, wyniki dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz spis literatury. Do rozprawy dołączono kolorowe kopie obu oryginalnych prac twórczych. W spisie treści zabrakło odniesienia do jednego z rozdziałów, zatytułowanego „wnioski”, który syntetycznie miał wskazać najważniejsze znaczenie wyników. Ewentualnie może stanowić integralną część rozdziału „Podsumowanie i wnioski”, gdzie pierwsza część tego rozdziału stanowi podsumowanie osiągnięcia, a dalej wyciągnięte wnioski.

Na wstępie chciałbym zaznaczyć, że zespół prof. Agnieszki Waclawik od wielu lat prowadzi badania m.in. z zakresu molekularnych mechanizmów decydujących o prawidłowym rozwoju wczesnej ciąży oraz komunikacji przedimplantacyjnego zarodka z matką u zwierząt gospodarskich. Opieka naukowa nad wyjaśnieniem roli prokinetyny 1 w regulacji ciała żółtego stanowi poszerzenie dotychczasowego obszaru badawczego. PROK1 to peptyd, który ulega silnej ekspresji w tkankach endokrynnych, np. nadnerczach,

jądrach, jajnikach, a także łożysku. Swoją aktywność biologiczną wypełnia za pośrednictwem dwóch receptorów sprzężonych z białkiem G, zwanych receptorem prokinetycy-1 (PROKR1) i -2 (PROKR2). Choć do tej pory nie opublikowano wiele prac opisujących funkcje PROK1 i 2, to na podstawie dotychczasowych doniesień uważa się, że prokinetycyny odgrywają istotną rolę w płodności u ludzi czy przeżuwaczy. Dużą rolę przypisuje się przede wszystkim w regulacji rozwoju łożyska czy szlaków sygnałowych rozpoznania wczesnych etapów ciąży (rozwoju zarodkowego), czy procesach angiogenezy. Wysoka ekspresja została odnotowana w pęcherzykach jajnikowych oraz ciałkach żółtych, a zaburzenia profilu ekspresji wiązano z patologią rozwoju łożyska, hipotrofii płodu i preeklampsją. Co ciekawe, w badaniach uwzględniających oocyty człowieka, w przebiegu procedury zapłodnienia pozaustrojowego, wykazano, że stężenie PROK1 w pęcherzykach jajnikowych może być biomarkerem potencjału rozwojowego, który jest niezwykle istotny dla efektywnego zapłodnienia i rozwoju zarodka przedimplantacyjnego.

Hipoteza pracy jest klarowna i jednoznaczna, a cele dobrze odzwierciedlają charakter przeprowadzonych badań. Doktorantka postawiła kilka zadań badawczych, odnosząc je do publikacji wchodzących w skład rozprawy. W rozprawie stawiane są istotne pytania, będące wynikiem i rozwinięciem prowadzonych przez zespół wcześniej badań. Obie prace składające się na rozprawę bardzo dobrze i szczegółowo dokumentują wykonane eksperymenty i rzeczowo opisują uzyskane wyniki. Autorka rozprawy projektując doświadczenia zadbała o dobór grup badanych poprzez stosowanie zmiennych stężeń czynników, ich dobór w różnych konfiguracjach czy stosowanie peptydów. Badania zostały zaprojektowane zarówno w warunkach hodowli *in vitro* oraz w warunkach *in vivo* z uwzględnieniem przetokowanych zwierząt. W badaniach wykorzystano kilka powszechnie wykorzystywanych technik biologii molekularnej, jak qPCR, Western-Blot, ELISA czy metody immunochemiczne z wykorzystaniem izotopów promieniotwórczych (RIA) włącznie, co świadczy o szerokim doświadczeniu na tym etapie kariery naukowej i przygotowaniu do dalszej pracy badawczej.

W samym skróconym opisie rozprawy doktorskiej zabrakło w mojej opinii charakterystyki genów i białek PROK1 oraz jej receptorów choćby w ujęciu graficznym. Zadania badawcze obejmowały w większości prace w oparciu o poziomy mRNA lub białka, stąd przydatna byłaby informacja o budowie genu kodującego PROK1 oraz ewentualnych izoformach. Ponadto, w opracowaniu nie znalazłem informacji o liczbie ujętych w doświadczeniu zwierząt, które natomiast znalazłem w załączonych publikacjach. Uważam jednak, że jest to jedna z głównych metodycznych informacji, które przed sięgnięciem do publikacji, zaspokajają ciekawość recenzenta. Ma to szczególne znaczenie w zaplanowanych doświadczeniach *in vivo*, podczas których zmienność osobnicza może wpływać istotnie na obserwowane zmienne. Autorka jednak zadbała o graficzne przedstawienie etapów badań, ułatwiając czytelnikowi rozróżnienie następujących po sobie doświadczeń, przy dużej ich zaplanowanej liczbie.

W rozdziale Materiał i metody, podrozdziale izolacja RNA i odwrotna transkrypcja oraz real time PCR, podobnie jak w załączonych pracach brakuje informacji czy stosowano kontrolę efektywności reakcji dla wszystkich analizowanych genów. Jest to szczególnie istotne, gdy ekspresja mRNA genów badanych jest porównywana między sobą, a nie wielka zmiana efektywności wprowadza duży błąd w odczycie początkowej ilości matrycy, który nie wynika z kontekstu biologicznego. Akronim CT nie oznacza pierwszego cyklu, w którym wykrywana jest emisja fluorescencji. Fluorescencja jest mierzona dla wszystkich prób w każdym cyklu, ale wartość CT (lub Cp, Cq) oznacza przekroczenie wartości fluorescencji tła reakcji. Chciałbym jednak docenić, że Autorka przeprowadziła analizę ekspresji mRNA biorąc pod uwagę wytyczne „MIQE guidelines” i typując geny referencyjne na podstawie ich stabilności. Dla zaspokojenia ciekawości, warto zawrzeć informację na ilu próbach taką walidację prowadzono i dlaczego wpisano pomiar stężenia wykorzystując zarówno Bioanalyzer oraz Nanodrop? Proponuję również stosowanie w opracowaniu polskojęzycznym terminu sondy hydrolizujące, a nie Taqman, która to stanowi chronione prawem oznaczenie komercyjnego



produktu firmy Roche.

Opis wyników i dyskusja są obszerne, a nawet wyczerpujące. W opracowaniu, zabrakło mi jednak argumentów związanych z liczbą obecnych na jajnikach ciałek żółtych. Czy znane są mechanizmy, które mogą odpowiadać za wzmożoną ekspresję czynników sygnalizacyjnych w zależności od architektury tkanki jajnikowej tj. liczby obecnych ciałek żółtych? Świnia domowa jako zwierzę poliowulacyjne, charakteryzuje się zmiennością liczby prosiąt w miocie. Ciekawe zatem wydaje się wyjaśnienie zależności pomiędzy liczbą rozwijających się zarodków i/lub stężeniem sygnałów wydzielanych przez rozwijające się zarodki względem responsywnej tkanki jajnikowej. Czy poziom ekspresji *PROK1* będzie zależał od liczby obecnych CL oraz jak może kształtować się w przypadku gatunków monoowulacyjnych? W drugiej pracy rozprawy (Therigenology) doświadczenia *in vitro* uwzględniają zwierzęta inseminowane w pierwszej rui. Czy takie podejście mogło wpłynąć na obserwowane wyniki? W przypadku badań na potencjale rozwojowym oocytów, a później zarodków, uważa się, że pierwszą inseminację najlepiej wykonywać po 2-3 naturalnych cyklach. W przypadku badań transkryptomicznych i proteomicznych nie zawsze, a nawet stosunkowo rzadko, obserwuje się korelację poziomów ekspresji genu i białka. W przypadku doświadczenia *in vitro* obserwowano podwyższoną ekspresję mRNA *PROK1* pod wpływem działania E2 oraz E2 i PGE2, a na poziomie białka, jedynie pod wpływem estradiolu. Jak można wyjaśnić taką zależność? Z kolei doświadczenie *in vivo* z administracją do jednego rogu hormonów skutkowało stosunkowo zróżnicowanym poziomem ekspresji mRNA *PROK1* w obrębie grup placebo. Zwracam uwagę, że w rozprawie zamiennie w kilku miejscach stosowany jest zapis „ekspresja mRNA” i „ekspresja genu” w jednoczesnym zestawieniu „ekspresji białka”. Zgodnie z centralnym dogmatem biologii molekularnej termin ekspresja genu obejmuje proces transkrypcji i translacji, więc w tym przypadku prawidłowo powinno stosować się zapis ekspresji na poziomie mRNA.

Rzecz jasna uwagi te nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, a skłaniają do dyskusji. Podsumowując uważam, że przedstawiona praca doktorska ma wysoką wartość merytoryczną, udokumentowaną cennymi wynikami, a przede wszystkim stanowiącymi oryginalne osiągnięcie badawcze, publikowane po raz pierwszy na tym gatunku i w takim ujęciu eksperymentalnym. Ponadto została napisana przystępnie, fachowym językiem o dobrej konstrukcji stylistycznej. Przede wszystkim w zaplanowanych kolejno eksperymentach Doktorantka wykazała po raz pierwszy profil ekspresji *PROK1* i jego zmiany pod wpływem działania czynników pochodzenia zarodkowego. Prokinetycyna 1 ogranicza proces luteolizy we wczesnej fazie ciąży oraz wpływa na syntezę progesteronu.

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Baryły spełnia warunki stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 poz. 1668) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr Moniki Baryły do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

KIEROWNIK KATEDRY

dr hab. Piotr Pawla