



Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

w Olsztynie

Wydział Biologii i Biotechnologii

Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt



ul. M. Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn, tel. 89-5233201

prof. dr hab. Iwona Bogacka
Tel. 89 523 44 20/ 89 523 42 58
e-mail: iwonab@uwm.edu.pl



Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Marii Marty Guzewskiej pt. *"Biogenesis and release of extracellular vesicles during communication between the embryo and the maternal endometrium during early pregnancy in pigs"*

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie (IRZiBŻ PAN w Olsztynie) z dnia 26 września 2023 roku. Praca została wykonana w Zakładzie Mechanizmów Działania Hormonów IRZiBŻ PAN w Olsztynie pod naukową opieką Pani prof. dr hab. Moniki Kaczmarek. Promotorem pomocniczym była Pani prof. Yael Heifetz (Department of Entomology, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel). Rozprawę doktorską stanowią trzy publikacje (dwie prace oryginalne i jedna przeglądowa) – niżej wyszczególnione – opublikowane w 2023 roku w czasopismach indeksowanych w *Journal Citation Reports*. Łączny 5-letni wskaźnik *Impact Factor* publikacji wynosi 16,2, a liczba punktów wyliczona na podstawie listy MEiN z 2021 roku – 380:

1. **Guzewska MM**, Myszczyński K, Heifetz Y, Kaczmarek MM. Embryonic signals mediate extracellular vesicle biogenesis and trafficking at the embryo-maternal interface. *Cell Communication and Signaling* 2023 Aug 18;21(1): 210. doi: 10.1186/s12964-023-01221-1 (*5-letni IF – 8.0; pkt. MEiN – 140*)
2. **Guzewska MM**, Witek KJ, Karnas E, Rawski M, Zuba-Surma E, Kaczmarek MM. miR-125b-5p impacts extracellular vesicle biogenesis, trafficking, and EV subpopulation release in the porcine trophoblast by regulating ESCRT -dependent pathway. *FASEB Journal* 2023 Aug; 37(8): e23054. doi: 10.1096/fj.202300710R (*5-letni IF – 5.2; pkt. MEiN – 140*)
3. **Guzewska MM**, Szuszkiewicz J, Kaczmarek MM. Extracellular vesicles: Focus on peri-implantation period of pregnancy in pigs. *Molecular Reproduction and Development* 2023 Jul; 90(7):634-645. doi: 10.1002/mrd.23664 (*5-letni IF – 3.0; pkt. MEiN – 100*)

Badania będące podstawą rozprawy doktorskiej realizowano w ramach projektów:

- 1) Konsorcjum Naukowe KNOW: „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność” (KNOW2016/IRZBŻ/PRO1/01/5; kierownik projektu: prof. Monika M. Kaczmarek);
- 2) PRELUDIUM finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (2018/29/N/NZ9/02331;

kierownik projektu mgr Maria M. Guzewska). Część badań zrealizowano również podczas pobytu na stażu doktoranckim w Department of Entomology, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel.

Publikacje są współautorskie (3-6 autorów), jednak Doktorantka jest pierwszym i wiodącym autorem w tych publikacjach. Jej wkład w powstawanie prac był dominujący (jak sama wskazuje wynosił ponad 50%, jednak jest to informacja mało precyzyjna i w mojej opinii zbędna) i obejmował udział w pozyskaniu funduszy, projektowaniu i realizacji eksperymentów, gromadzeniu danych, analizach i interpretacji uzyskanych wyników (w tym w analizach bioinformatycznych), przygotowaniu grafik i manuskryptów oraz odpowiedzi na recenzje. Wszystkie wymienione aktywności Doktorantki zostały potwierdzone przez współautorów w załączonych oświadczeniach, a co istotne ich treści w tym zakresie są tożsame z treściami zawartymi w publikacjach. Zbiór publikacji stanowiących rozprawę doktorską poprzedza 60-stronicowe anglojęzyczne opracowanie, w skład którego wchodzi: *Streszczenie* w języku angielskim oraz polskim, *Wykaz skrótów*, *Zestawienie publikacji stanowiących rozprawę doktorską*, *Wstęp*, *Hipoteza i cele badawcze*, *Materiał i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Perspektywy na przyszłość*, *Wnioski*. Opracowanie zawiera również obszerną *Bibliografię* (157 pozycji, zdecydowana większość z ostatnich 10 lat) oraz *Oświadczenia współautorów*. Pod względem formalnym oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane tego typu opracowaniom.

Ocena merytoryczna rozprawy

Podstawą przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej są trzy prace naukowe (dwie oryginalne i jedna przeglądowa) opublikowane w bardzo dobrych czasopismach o międzynarodowym zasięgu. Należy podkreślić, że są one tematycznie spójne i skupiają się wokół wyodrębnionego problemu dotyczącego określenia mechanizmów regulujących biogenezę, transport wewnątrzkomórkowy oraz wydzielanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) podczas komunikacji pomiędzy zarodkiem a endometrium matki w początkowym okresie ciąży.

Zsynchronizowanie rozwoju zarodka z jednej strony i osiągnięcie przez macicę stanu receptywności z drugiej strony jest jednym z kluczowych ale i złożonych procesów, który decyduje o prawidłowym przebiegu ciąży. Dotychczasowe wyniki badań jasno wskazują, że skoordynowana w czasie dwustronna współpraca pomiędzy blastocystą a nabłonkiem powierzchniowym macicy wymaga udziału sygnałów zarodkowych – głównie estradiolu (E2) i prostaglandyny E2 (PGE2), natomiast nieliczne dane dotyczą określenia potencjalnej roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) – wielozadaniowych nanostruktur wydzielanych przez różne komórki organizmu. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, a zwłaszcza ich molekularny ładunek, to nie tylko nośnik informacji, ale też niezwykle istotny modulator sygnalizacji międzykomórkowej na poziomie lokalnym oraz między odległymi od siebie komórkami. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, transportując bioaktywne cząsteczki (m. in. białka, lipidy, kwasy nukleinowe, metabolity, miRNA) odgrywają niezwykle rolę w regulacji procesów fizjologicznych, w tym rozrodczych. Dotychczasowe badania sugerują, że EVs z funkcjonalnym biologicznym ładunkiem mogą być istotnymi modulatorami wielu procesów związanych z ciążą, w tym implantacji, migracji i inwazji trofoblastu. Obecnie wiadomo, że pęcherzyk jajnikowy z płynem pęcherzykowym, endometrium, a także komórki zarodkowe i trofoblasty mogą stanowić ważne źródło EVs w modulowaniu funkcji komórek. Pomimo, że określenie roli EVs w międzykomórkowej komunikacji we wczesnej ciąży było już przedmiotem badań u różnych gatunków, jednak nie obejmowały one ważnego obszaru – komunikacji na styku komórek

zarodek-endometrium. Zatem uważam, że podjęte przez Doktorantkę są ciekawe i ważne, a przedstawione nowe wyniki w pewnym stopniu tę lukę uzupełniają. Tematyka badawcza, którą wybrała Doktorantka jest aktualna i w pełni uzasadniona, a co również istotne wpisuje się w obszary naukowe, którymi od kilku lat zajmuje się zespół badawczy kierowany przez Panią prof. M. Kaczmarek. Należy podkreślić, że badania te są również nowatorskie, ponieważ realizowane były w dużej części w ramach projektów finansowanych ze środków zewnętrznych (w jednym z nich Doktorantka pełniła funkcję kierownika), a nowatorstwo to element, który jest wnikliwie analizowany przez zespoły ekspertów i recenzentów.

Doktorantka przyjęła hipotezę zakładającą, że proces biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na styku komórek zarodka i matki jest regulowany przez hormony i miRNA pochodzenia zarodkowego, które odgrywają znaczącą rolę w dialogu pomiędzy zarodkiem i matką we wczesnych etapach ciąży. W celu weryfikacji postawionej hipotezy Doktorantka przeprowadziła badania dotyczące: 1) zidentyfikowania i analizy rozmieszczenia pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) i ciał wielopęcherzykowych (MVBs) na styku komórek zarodek-matka; 2) określenia profilu ekspresji białek zaangażowanych w biogenezę i transport pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w błonie śluzowej macicy i zarodkach/trofoblastach; 3) określenia wpływu sygnałów istotnych w dialogu zarodek-matka na proces biogenezy i transportu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w obrębie trofoblastu i komórek nabłonka powierzchniowego błony śluzowej macicy. W mojej opinii wszystkie zadania badawcze zostały zrealizowane, a postawiona hipoteza poprawnie zweryfikowana. Analizy *ex vivo*, *in vitro* i *in silico* zostały przeprowadzone z wykorzystaniem szeregu metod badawczych, m. in. technik biologii molekularnej, obrazowania tkanek i komórek (m. in. transmisyjna mikroskopia elektronowa, immunofluorescencyjne barwienie komórek/ tkanek, obrazowanie konfokalne), hodowli komórkowych *in vitro* (pierwotne kultury komórkowe uzyskane z nabłonka powierzchniowego błony śluzowej macicy oraz trofoblastu świni). Cennym uzupełnieniem prowadzonych badań były analizy bioinformatyczne. Wszystkie analizy zostały prawidłowo dobrane do założonych celów badawczych i z pewnością wymagały dużego nakładu pracy. Właściwie dobrane i opisane zostały również analizy statystyczne wykorzystane przy opracowaniu uzyskanych wyników.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania Pani mgr Marii Guzewskiej dostarczyły wielu nowych i oryginalnych danych. Badania z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej potwierdziły obecność EVs i MVBs na styku komórek zarodka i endometrium matki podczas wczesnych etapów implantacji zarodka, wskazując na wzmożoną komunikację z udziałem EVs. Wskazano, że obie strony dialogu zarodkowo-matczynego ściśle współpracują ze sobą, ponieważ synteza, a przede wszystkim wydzielanie EVs wyraźnie zbiega się z sekrecją sygnałów zarodkowych – E2 i PGE2 – podczas matczynego rozpoznania ciąży. Stwierdzono różne mechanizmy wydzielania EVs w badanych tkankach: sposób merokrynowy – w przypadku komórek trofoblastu i nabłonka powierzchniowego endometrium oraz apokrynowy – głównie dla komórek trofoblastu (wzmożony w okresie intensywnego rozwoju zarodka w 12. dniu ciąży). Ponadto, immunofluorescencyjne barwienia pozwoliły na zlokalizowanie na styku komórek zarodka i endometrium białek regulujących biogenezę oraz wydzielanie EVs, (białka kompleksu ESCRT: VPS37B i ALIX, białko RAB27A) oraz umożliwiły określenie profilu ich ekspresji w zależności od typu komórek oraz dnia ciąży. Interesujące są wyniki badań Autorki, które kompleksowo opisują profile ekspresji genów regulujących biogenezę, transport i wydzielanie EVs w endometrium w czasie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży (geny kodujące białka kompleksu ESCRT-I, ESCRT-II oraz białka Rab). Charakterystyczne wzorce ekspresji badanych

genów wydają się pozostawać pod wpływem sygnałów zarodkowych (endometrium) i stadium implantacji (zarodki), a spójny wzór ekspresji zaobserwowany dla genów kompleksu ESCRT-I oraz ESCRT-II zarówno w endometrium, jak i zarodkach/trofoblastach wskazuje na wspólne mechanizmy regulacyjne. Interesujące są także analizy *in silico*, które wskazały możliwe miejsca wiązania E2 i PGE2 w regionach promotorów genów zaangażowanych w biosyntezę i transport EVs (dotyczy to dwóch genów kodujących białka kompleksu ESCRT-II – VPS25 i VPS36), co wskazuje, że pozostają one pod kontrolą sygnałów zarodkowych. Szczególnie istotne wydają się wyniki badań *in vitro*, które demonstrują, że sygnały pochodzenia zarodkowego (głównie E2 przez ESR1) regulują w endometrium geny kodujące białka kompleksu ESCRT-II (VPS25 i VPS36). Stosując hodowle pierwotne komórek, pozyskane z nabłonka powierzchniowego endometrium oraz trofoblastów, stwierdzono zaangażowanie miR-125b-5p w regulację procesów biogenezy i transportu EVs w obu typach komórek. Należy podkreślić, że Doktorantka po raz pierwszy wykazała, że zależna od białek kompleksu ESCRT (głównie białka VPS36 kompleksu ESCRT-II) biogeneza i wydzielanie EVs w komórkach trofoblastu świń jest modulowana przez miR-125b-5p. Istotnym elementem jest również analiza *in silico*, która wskazała możliwość interakcji pomiędzy miR-125b-5p a genami kompleksu ESCRT, co zostało dodatkowo potwierdzone przez zmniejszoną ilość mRNA po transfekcji komórek trofoblastu świń za pomocą miR-125b-5p. Zidentyfikowane wzajemne oddziaływanie miRNA-ESCRT skutkowało powstaniem i wydzielaniem określonych subpopulacji EVs (wzrost populacji CD 63+) sugerując, że miRNA obecne na styku komórek zarodek-matka jest ważnym regulatorem komunikacji za pośrednictwem EVs.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań są ciekawe i świadczą o złożoności mechanizmów kontrolujących interakcję pomiędzy zarodkiem a macicą w okresie macicznego rozpoznania ciąży i w czasie implantacji. Należy podkreślić, że eksperymenty przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej po raz pierwszy wykazały istotną rolę sygnałów zarodkowych jako czynników odpowiedzialnych za wybór szlaku biogenezy i uwalniania EVs podczas wczesnej ciąży. Uzyskane wyniki stanowią także solidną podstawę do prowadzenia kolejnych badań zmierzających do pełniejszego poznania tego niezwykle złożonego procesu (o przyszłych planach i obecnie prowadzonych badaniach Autorka pisze w rozdziale „*Future perspectives*” opracowania). W dyskusjach zamieszczonych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz w opracowaniu dokonano wnikliwej analizy i interpretacji uzyskanych wyników. W mojej opinii, sformułowane wnioski jednoznacznie weryfikują postawioną w pracy hipotezę badawczą. Na pochwałę zasługuje staranne, jasne i przejrzyste przygotowanie opracowania wzbogaconego rycinami, które bardzo ułatwiają analizę tekstu. Moją uwagę zwrócił umiejętnie zaprezentowany w postaci graficznej układ doświadczalny w rozdziale „*Materials and methods*” opracowania. Wszystkie te elementy świadczą o zrozumieniu podjętej tematyki badawczej.

W trakcie analizy artykułów będących podstawą rozprawy ale także opracowania nie doszukałam się problematycznych elementów i trudno było mi sformułować krytyczne uwagi. Prace naukowe opublikowano w prestiżowych czasopismach o międzynarodowym zasięgu i wysokich wskaźnikach bibliometrycznych, i z pewnością zostały rzetelnie ocenione przez szerokie grono recenzentów oraz redaktorów czasopism. Niemniej jednak nasunęło mi się kilka uwag/pytań, którymi chciałabym się podzielić:

1. Drobną uwagę dotyczy nieprecyzyjnego opisu okresów ciąży. Na przykład, w publikacji nr 1, w podrozdziale *Animals*, wskazano, że do transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykorzystano tkanki pozyskane od loszek w dniach 12., 16. i 20. ciąży, natomiast

- do izolacji mRNA i barwień fluorescencyjnych przeznaczono tkanki pozyskane w dniach 11.-12., 15.-16. oraz 17.-19. ciąży.
2. W publikacji 2, w podrozdziale *Animals*, wskazano liczbę n – zarodków wykorzystanych do izolacji mRNA. Od ilu loszek je pobrano? Co zadecydowało o wyborze do badań mieszańców świń ras Hampshire x Duroc? Ile średnio zarodków pobierano od jednej loszki tej rasy?
 3. Brakuje konsekwencji w doborze genów referencyjnych podczas normalizacji ekspresji genów za pomocą real-time PCR (w publikacji nr 1, fig. 6 i 7 – odpowiednio GAPDH i HPRT1, natomiast w publikacji nr 2, fig. 1 – średnia geometryczna GAPDH i ACTB, a fig. 2 – GAPDH). Proszę o krótki komentarz na temat tych różnic.
 4. Do pierwotnych hodowli komórek pobrano macice od loszek w 11.-12. dniu cyklu rujowego w celu izolacji komórek nabłonka powierzchniowego endometrium (pLE), natomiast zarodki pobierano w 16. dniu ciąży (schemat nr 4 opracowania anglojęzycznego wskazuje 15-16) w celu izolacji komórek trofoblastu (pTr). Proszę o komentarz, dlaczego dokonano takiego właśnie wyboru fazy cyklu i wieku zarodka?
 5. Mechanizmy regulujące biogenezę MVBs/EVs są głównie związane z udziałem kompleksu ESCRT, niemniej jednak możliwe są również sygnałowe ścieżki ESCRT-niezależne. Mówiąc w podsumowaniu publikacji 2 o konieczności wyjaśnienia takich mechanizmów w kontekście komunikacji na styku zarodek-matka jakie możliwości kolejnych badań brałaby Pani pod uwagę?
 6. Ważnym w rozwoju i utrzymaniu ciąży jest zaangażowanie układu immunologicznego w dialog pomiędzy matką a zarodkiem, a reakcje immunologiczne występujące na styku matka-płód w obrębie endometrium we wczesnych fazach ciąży są bardzo złożone. Wiadomym jest, że zaangażowanych jest wiele rodzajów komórek immunologicznych i molekuł o właściwościach immunomodulujących. Jaka jest rola EVs we wspomnianych reakcjach?
 7. Czy może Pani wskazać trudności/ograniczenia podczas prowadzenia badań?
 8. Czy prowadzone przez Panią badania nad biogenezą i znaczeniem EVs w regulacji procesów rozrodczych mogą być istotne z punktu widzenia klinicznego? Innymi słowy, czy widzi Pani możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników badań?

PODSUMOWANIE

Reasumując, rozprawa doktorska Pani mgr Marii M. Guzewskiej jest spójnym, starannie przemyślanym dziełem naukowym. Zawiera nowe i wartościowe pod względem poznawczym dane naukowe, stanowiąc cenne uzupełnienie wiedzy z zakresu biologii rozrodu. Uzyskane wyniki prezentują niepoznany dotąd mechanizm nadzorujący biogenezę oraz transport wewnątrzkomórkowy EVs, zachodzący z udziałem sygnałów zarodkowych (E2 i PGE2) i miRNA, który prowadzi do przeprogramowania ścieżek biogenezy EVs w endometrium i w komórkach trofektodermi zarodka, a także wydzielania określonej populacji EVs podczas wczesnej ciąży. Autorka wykazała się doskonałą znajomością piśmiennictwa i umiejętnością rozwiązywania problemu naukowego. Umiejętność doboru i opanowanie nowoczesnych technik badawczych, odpowiedniej interpretacji otrzymanych danych, a także wykazanie się zdolnością do opracowania i przygotowania do druku publikacji naukowych wskazuje, że Doktorantka jest właściwie przygotowana do samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Doceniam szeroki zakres prowadzonych badań naukowych oraz kompleksowe podejście do rozpatrywanego problemu. Dwie oryginalne prace, będące podstawą rozprawy doktorskiej, są rzetelnie

przygotowane, zawierają jasno określone cele, uzupełnione starannym opisem przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych wyników oraz wnikliwą i dojrzałą dyskusją. Ponadto, uwzględnienie w zbiorze publikacji pracy przeglądowej (z pierwszym autorstwem w bardzo dobrym czasopiśmie), która w sposób krytyczny podsumowuje stan aktualnej wiedzy na temat biologii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych we wczesnej ciąży u świni świadczy o dojrzałości Doktorantki. Można zatem sądzić, że Doktorantka zdobyła doświadczenie i niezbędne umiejętności przydatne w przyszłej pracy badawczej.

WNIOSEK KOŃCOWY

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. *„Biogenesis and release of extracellular vesicles during communication between the embryo and the maternal endometrium during early pregnancy in pigs”* spełnia wymogi na podstawie art. 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), a zatem zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Marii Marty Guzewskiej oraz dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Jednocześnie biorąc pod uwagę nowatorską tematykę podjętych badań, wysoki poziom naukowy uzyskanych wyników, co znalazło odzwierciedlenie w opublikowaniu ich w prestiżowych czasopismach z zakresu biologii rozrodu, wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem,



prof. dr hab. Iwona Bogacka

Olsztyn, 08. listopad 2023 r.