

Dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
Tel. 012 664 50 03
agnieszka.rak@uj.edu.pl

Kraków, dn.16.12.2022r.



RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ MGR PAWŁA LIKSZO

pt. *„Analiza zmian proteomu ciała żółtego podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży u świni domowej”.*

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, zgodnie z wymaganiami ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003, nr 65, poz.595 z późn. zm.).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Immunologii i Patologii Rozrodu, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie pod opieką naukową Pani dr hab. Beenu Moza Jalali. Podstawą rozprawy doktorskiej są dwie spójnie tematycznie publikacje naukowe:

Likszo P, Skarzynski DJ, Moza Jalali B. Proteomic Analysis of Porcine Pre-ovulatory Follicle Differentiation Into Corpus Luteum. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:774. doi: 10.3389/fendo.2019.00774.

Likszo P, Skarzynski DJ, Moza Jalali B. Changes in Porcine Corpus Luteum Proteome Associated with Development, Maintenance, Regression, and Rescue during Estrous Cycle and Early Pregnancy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11740. doi: 10.3390/ijms222111740.

Publikacje te ukazały w się w bardzo dobrych, recenzowanych, międzynarodowych czasopismach z listy Journal Citation Reports: *Frontiers in Endocrinology* (IF 3.55) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (IF 5.94) w latach 2019 i 2021. Czasopisma te znajdują się również w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki z przyznanymi odpowiednio punktami 100 i 140. Łączny współczynnik wpływu impact factor czasopism stanowiących podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo wynosi 9.49, a suma punktów MEiN to 240. W obu publikacjach Pan mgr Paweł Likso jest pierwszym autorem, a Jego wkład w ich powstanie zgodnie z załączonymi oświadczeniami obejmuje pobieranie materiału do badań, wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie i interpretację wyników, współudział w przygotowaniu manuskryptów do druku. Przedstawione publikacje zostały opatrzone opracowaniem przygotowanym w języku polskim, na które składają się: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, informacja

o opublikowanych oryginalnych pracach stanowiący podstawę doktoratu, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, hipoteza badawcza, cel pracy i zadania badawcze, materiał i metody, wyniki, dyskusja podsumowanie oraz 123 pozycje literatury. Badania do pracy doktorskiej wykonano w oparciu o środki finansowe pochodzące z Narodowego Centrum Nauki, projekt nr DEC-011/01/B/NZ4/03542 oraz środków statutowych Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy określenia molekularnego mechanizmu zmian profilu proteomicznego w ciałku żółtym (CL) świni domowej w kluczowych etapach cyklu estralnego. Podjęty przez Doktoranta temat uważam za interesujący bowiem efektywność rozrodu sów zależy m.in. od prawidłowej morfologii, biochemii i funkcji komórek CL. Zaburzenia powstałe podczas formowania CL, jego pełnej funkcjonalności czy luteolizy wiążą się z niewydolnością fazy lutealnej, problemami z zacięciem w ciążę czy implantacją zarodka oraz poronieniami. Istotnym jest również fakt, iż CL świni podobnie jak u kobiet przechodzi etapy formowania się, pełnej funkcjonalności oraz regresji, w przeciągu kilkunastu dni, co sprawia, że wymaga to od organizmu uruchomienia wielu mechanizmów pozwalających zachować jego stabilność podczas ciąży, m.in. poprzez aktywację szeregu cytokin, hormonów czy czynników wzrostu. Dotychczas wykazano, że aktywność komórek CL regulowana jest przez czynniki wydzielane przez przysadkę mózgową, jajniki, macicę, łożysko i zarodek; czynniki te mogą działać luteotropowo, wspierając czynność CL lub luteolitycznie. Od kilkunastu lat prowadzone są badania nad regulacją funkcji komórek CL wielu gatunków zwierząt w tym sów, jednak wiedza na temat zmian w globalnym proteomie komórek CL jest niewielka. Nieliczne publikacje naukowe wskazują na zmiany w profilu genów i białek CL sów w czasie jego formowania, pełnej funkcjonalności, regresji czy podczas wczesnej ciąży. Stąd, uważam, że wybór tematu jest istotny, zmierzający do zrozumienia mechanizmów kontrolujących funkcjonowanie CL w kluczowych etapach jego trwania, a tym samym dostarczenia nowych informacji o regulacji funkcji jajnika sów.

Doktorant w swojej dysertacji porównał profil proteomiczny pęcherzyka przedowulacyjnego (POF) z wczesnym CL, następnie analizował proteom CL w różnych etapach cyklu rujowego (luteinizacji, pełnej funkcjonalności, luteolizy) i wczesnej ciąży oraz badał możliwy mechanizm luteolizy indukowanej przez prostaglandynę F2 α (PGF2 α). Autor jako model prowadzonych badań wybrał samice sów domowej (*Sus scrofa domestica*). Ze względu na postawione hipotezy badawcze, zakładające zmiany profilu proteomicznego w CL zależne od stanu fizjologicznego loszek Doktorant podzielił samice na 5 grup badawczych, które stanowią dzień 3, dzień 9, dzień 12 i dzień 15 cyklu rujowego oraz okres wczesnej ciąży (dzień 15 ciąży). Do analizy proteomu wykorzystał dwukierunkową elektroforezę żelową i tandemową spektrometrię mas (MALDI TOF-TOF MS/MS). Analizę funkcjonalną *in silico* z użyciem Ingenuity Pathway Analysis (IPA) wykorzystał do identyfikacji funkcji molekularnych i procesów biologicznych związanych z białkami o zróżnicowanej ekspresji w wykonanych porównaniach. Do walidacji otrzymanych wyników użył analizy Western blot w systemie 1-DE i 2-DE oraz barwienia immunofluorescencyjne. Dodatkowo, w celu określenia możliwego mechanizmu luteolizy indukowanej przez endogenną PGF2 α Pan mgr Paweł Likszo wykorzystał hodowle *in vitro* skrawków CL. Za pomocą metody radioimmunoenzymatycznej oznaczył poziom hormonów steroidowych w płynie pęcherzykowym, osoczu i medium pohodowlanym. Wszystkie otrzymane wyniki poddał analizie statystycznej.

Oceniana rozprawa doktorska ma charakter opracowania, której zasadniczą część stanowią dwie oryginalne prace naukowe, które zostały już poddane wnikliwej ocenie minimum przez czterech

recenzentów i dwóch edytorów czasopism o zasięgu międzynarodowym, zatem moja rola sprowadza się do omówienia ogólnych założeń przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej oraz ewentualnych uwag czy dyskusji z Autorem o wadze prac. Wartość poznawczą i naukową wyników otrzymanych przez Pana mgr Pawła Likso oceniam dobrze. Jestem przekonana, że nowe wyniki badań Doktoranta i Zespołu dotyczące analizy profilu proteomicznego komórek CL będą w istotny sposób inspirować do kontynuacji badań w tym zakresie. Prace są spójne tematycznie i metodycznie, a jako całość dostarczają istotnej wiedzy z zakresu regulacji funkcjonowania CL w cyklu rujowym oraz wczesnej ciąży sów i stanowią odpowiedź na założone przez Doktoranta cele badawcze. Prace napisane są zrozumiale, z jasno sprecyzowanymi celami i prawidłowo przeprowadzoną dyskusją.

W pracy Likso i współ. (2019) *Proteomic Analysis of Porcine Pre-ovulatory Follicle Differentiation Into Corpus Luteum*. *Front Endocrinol*, Doktorant skupił się na porównaniu proteomu POF z proteomem wczesnego CL. Na podstawie przeprowadzonych analiz z zastosowaniem elektroforezy 2-DE zidentyfikował 422 białka wraz z ich proteoformami. Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że proteom POF reprezentowany jest głównie przez białka strukturalne, białka wiążące wapń oraz białka zaangażowane w układ ubikwityna-proteasom. W przypadku profilu proteomicznego wczesnego CL zaobserwował silną ekspresję inhibitorów proteaz oraz białek zaangażowanych w transport i syntezę lipidów. Następnie używając programu IPA określił udział badanych białek w szlakach biochemicznych oraz funkcjonalnych. Wykazał, że wśród wszystkich zidentyfikowanych białek w proteomie POF najważniejsze procesy obejmowały ubikwitynację białek, odpowiedź na stres endoplazmatyczny, przebudowę cytoskieletu i odpowiedź na niesfałdowane białka. W analizie profilu proteomicznego wczesnego CL białka zostały powiązane ze szlakami metabolizmu steroidów, ubikwitynacji białek, odpowiedzią na stres oksydacyjny i sygnalizacją odpowiedzi ostrej fazy. Porównując profile białkowe POF z wczesnym CL Doktorant wykrył 167 białek zidentyfikowanych jako białka o zróżnicowanej ekspresji (DEPs), których funkcje obejmują przetrwanie i śmierć komórek, metabolizm steroidów, ruch komórkowy czy transport molekularny. Ponadto, zidentyfikował szereg szlaków kanonicznych, które wspierają proces luteinizacji. Walidację otrzymanych wyników Pan mgr Paweł Likso wykonał badając ekspresję białek PDIA3, HSP60, ceruloplazminy, AKR1B1, białka wiążącego witaminę D oraz SELENBP1 metodą Western blot.

W drugiej publikacji Likso i współ. (2021) *Changes in Porcine Corpus Luteum Proteome Associated with Development, Maintenance, Regression, and Rescue during Estrous Cycle and Early Pregnancy* Doktorant postawił sobie ambitny cel porównania profilu proteomicznego CL z 3 dnia cyklu z CL z 9 dnia cyklu, proteom CL z 9 dnia cyklu z CL z 12 dnia cyklu, proteomu CL z dnia 12 cyklu z CL luteolitycznym z 15 dnia cyklu, oraz proteomu CL luteolitycznego z 15 dnia cyklu z CL z 15 dnia ciąży. Analizując ogrom otrzymanych wyników Pan mgr Paweł Likso stwierdził:

- ✓ Wyższą ekspresję dla 154 białek w CL z 9 dnia cyklu (w tym białka transportowe, białka ochrony przed stresem oksydacyjnym, białka opiekuńcze, białka regulujące ruchliwość komórek) oraz dla 37 białek CL z 3 dnia cyklu (w tym inhibitory proteaz serynowych, białka układu dopełniacza). Analiza przeprowadzona w programie IPA wykazała, że w CL z dnia 9 cyklu DEPs były związane ze wzrostem komórkowym, endocytozą, angiogenezą, koncentracją lipidów i triacylogliceroli, wspierając tym samym wzrost lutealny oraz steroidogenezę w komórkach CL.
- ✓ Zwiększoną ekspresję dla 56 białek w CL z 12 dnia cyklu oraz dla 11 białek w CL z 9 dnia cyklu. Utrzymanie funkcji lutealnej (od 9 do 12 dnia cyklu) wiązało się ze zwiększeniem ekspresji białek szlaku biosyntezy steroidów, przeżywalnością komórek i białek związanych z migracją komórek.

Wykazał również zwiększoną ekspresję części białek związanych z łagodzeniem stresu oksydacyjnego w CL z dnia 12 cyklu. Dodatkowo w analizie funkcjonalnej CL z dnia 12 cyklu stwierdził zwiększenie ekspresji białek związanych z odpowiedzią immunologiczną na makrofagi oraz obniżenie poziomu białek związanych z homeostazą energetyczną czy stresem oksydacyjnym.

- ✓ Różnice w ekspresji białek CL z dnia 12 cyklu z poziomem białek CL z dnia 15 cyklu. Białka wykazujące zwiększoną ekspresję w CL z 12 dnia sklasyfikował do białek zaangażowanych w organizację komórki, proces translacji, metabolizm lipidów i odpowiedź na stres oksydacyjny. Natomiast białka o zwiększonej ekspresji w CL z 15 dnia cyklu powiązał z przebudową komórek, odpowiedzią ostrej fazy czy aktywnością proteolityczną.
- ✓ Zwiększenie ekspresji 67 białek oraz zmniejszenie poziomu 43 białek w CL 15 dnia ciąży w porównaniu do CL z 15 dnia cyklu. Zidentyfikowane białka o zwiększonej ekspresji uczestniczyły głównie w procesie steroidogenezy i apoptozy. Wśród zidentyfikowanych szlaków kanonicznych w ciążowym CL wskazał endocytozę za pośrednictwem klatryny i ścieżkę biosyntezy cholesterolu. Ponadto utrzymanie funkcji lutealnej CL wiązało się również ze znacznym obniżeniem ekspresji białek związanych z sygnalizacją śmierci komórki i tworzeniem reaktywnych form tlenu.

Doktorant również w tej publikacji wykonał walidację otrzymanych wyników poprzez zbadanie ekspresji białka dla APOA1, HSP27, CP, GC metodą Western blot oraz określenie lokalizacji białka APOA1 w CL z dnia 3, 9, 12, 15 cyklu estralnego i 15 dnia ciąży metodą immunofluorescencyjną. Dodatkowo, Pan mgr Paweł Likszo przeprowadził hodowle *in vitro* skrawków CL z dnia 9 i 12 cyklu estralnego z triklosanem (inhibitorem sulfotransferazy) podanym łącznie z PGF2 α i estradiolem (E2). Po wykonaniu oznaczeń poziomu progesteronu (P4) w medium podhodowlanym wykazał, że łączne podanie triklosanu z PGF2 α i E2 obniża istotnie statystycznie poziom badanego steroidu w obu badanych grupach.

Po przeczytaniu ww. prac nasuwa mi się kilka pytań, komentarzy i uwag. Proszę o ustosunkowanie się do nich:

- proszę o uzupełnienie informacji o rasie i wieku świń z których izolowano POF i wczesne CL (publikacja 1)
- czy używane przeciwciała do analizy Western blot czy immunohistochemii były walidowane, np. w eksperymencie z peptydem blokującym? Czy użyte przeciwciała były specyficzne dla świni? Czy Doktorant rozważał dodanie pozytywnej kontroli, jeżeli po raz pierwszy wykazał ekspresję niektórych białek w świńskim CL? Moim zdaniem w dokumentacji wyników powinny być umieszczone masy cząsteczkowe badanych białek
- dlaczego w walidacji wyników metodą Western blot (publikacja 2), Doktorant zdecydował się badać ekspresję białek APOA1 i HSP27 metodą Western blot 2-D, a pozostałe białka CP i GC metodą Western blot 1-D?
- czy w kontekście otrzymanych wyników immunolokalizacji białka APOA1 głównie w dużych komórkach lutealnych Doktorant rozważał badania porównujące zmiany w ekspresji badanych białek w zależności od typu komórek budujących CL. Moim zdaniem, ciekawe byłoby porównanie profilu proteomicznego komórek warstwy ziarnistej i osłonki wewnętrznej POF z małymi i dużymi komórkami lutealnymi. Po pierwsze, oba typy komórek pęcherzyka współgrają w wielu procesach fizjologicznych regulujących rozród m.in. steroidogenezie, a po drugie z komórek warstwy ziarnistej kształtują się duże komórki lutealne a z osłonki małe komórki lutealne. Myślę, że byłyby to wartościowe wyniki badań procesu luteinizacji CL. Proszę o komentarz do uwagi.

- w publikacji 2 Doktorant mierzył poziom P4 w surowicy krwi świń w cyklu rujowym, czy rozważał wykorzystać wyniki do analizy korelacji pomiędzy stężeniem tego steroidu we krwi a poziomem wybranych białek w CL?
- proszę o wyjaśnienie wyników badań *in vitro* braku wpływu E2 i PGF2 α na sekrecję P4. W dostępnych danych literaturowych oba hormony obniżają sekrecję P4 przez komórki lutealne świń. Moim zdaniem tytuł tego zadania badawczego (czyli mechanizm luteolizy indukowanej przez PGF2 α) powinien brzmieć udział sulfotransferazy estrogenowej w regulacji sekrecji P4 przez CL z 9 i 12 dnia cyklu rujowego po podaniu PGF2 α i E2. Czy Doktorant rozważał eksperyment dawko – zależnego wpływu E2 i PGF2 α na sekrecję P4? Czy brał pod uwagę analizę aktywności enzymatycznej i ekspresji białka SULT po zastosowaniu Triclosanu?
- proszę o uzupełnienie z jakiej liczby zwierząt i ile CL użyto do hodowli *in vitro* skrawków CL. Ile razy powtarzano ten eksperyment? Jakiej wielkości były hodowane eksplanty CL?
- proszę o wyjaśnienie wkładu Doktoranta w powstanie obu publikacji ponieważ informacje podane w załączonych oświadczeniach nie są tożsame z wkładem autorów w powstanie obu publikacji
- proszę o informację czy Doktorant brał udział we wszystkich analizach bioinformatycznych uzyskanych wyników? Czy korzystał z pomocy bioinformatyka?
- jakie dodatkowe eksperymenty wyjaśniające funkcjonalność badanych białek w procesach luteinizacji, pełnej aktywności i luteolizie CL świń może zaproponować Doktorant?
- czy Doktorant może wskazać ograniczenia swoich badań?
- w jaki sposób, uzyskane na świńskim modelu wyniki, mogą być wykorzystane w przyszłości w badaniach patofizjologii rozrodu kobiet? Proszę o krótki komentarz o aplikacji badań uzyskanych w ramach pracy doktorskiej.

Z obowiązku recenzenta muszę stwierdzić, że w części polskojęzycznej opracowania znalazło się wiele skrótów myślowych, błędów edytorsko- stylistycznych i nieścisłości:

- w streszczeniu pracy (str. 11) Doktorant używa pojęcia „wczesne białka lutealne”, myślę, że miał na myśli białka wczesnego CL
- w streszczeniu pracy (str. 12) zabrakło opisu wyników z eksperymentu *in vitro*, Doktorant ogólnikowo opisał „udział metabolizmu estrogenów w luteolizie indukowanej przez PGF2 α ”. Ten wniosek wydaje się być nadinterpretacją, ponieważ metabolizm estrogenów nie ogranicza się tylko do aktywności sulfotransferaz ale jest to złożony proces w którym bierze udział wiele enzymów i hormonów.
- nie zgodzę się z informacją, że w pracy po raz pierwszy zidentyfikowano w CL świń białka związane z metabolizmem E2: SULT i COMT (str. 12, str. 49). Publikacja prof. Gregoraszczyk i współ. (2015) *Environ Toxicol Pharmacol* 40(2):498-507. doi: 10.1016/j.etap.2015.07.011 opisuje ekspresję białka oraz aktywność SULT i COMT we wczesnym, środkowym i późnym CL świń
- w zadaniach badawczych (str. 22) zabrakło punktu badań *in vitro*: możliwego mechanizmu luteolizy indukowanej przez endogenną PGF2 α
- rycina 1 (str. 23) powinna być cytowana w tekście opracowania
- moim zdaniem w opracowaniu po dodanych oryginalnych publikacjach Doktorant powinien umieścić materiały dodatkowe (Supplementary Materials) do obu publikacji, w przypadku 1 publikacji jest to 5 tabel i prezentacja z 5 slajdami; w przypadku 2 publikacji jest to 7 tabel i 1 figura
- skróty wprowadzone za pierwszym razem w pracy powinny być konsekwentnie stosowane, np. Doktorant wprowadził skrót POF – pęcherzyk przedowulacyjny a zdarza się (str. 32) używać naprzemiennie skrót – nazwa pełna, co nie potrzebnie wprowadza chaos w tekście

- liczne błędny stylistyczne, np. str. 33, „białek związanych w łagodzeniem stresu” powinno zastąpić „białek związanych z łagodzeniem stresu”, w podsumowaniu (str. 47) np. żółtęgo, ciała, endocytoza, w opisie wyników (str. 31) zamiast funkcja wolne rodniki – wolnych rodników... w podsumowaniu (str. 49) „zgodnie z naszą najlepszą widzą” jest to zapożyczenie z języka angielskiego błędnie napisane

- moim zdaniem w podsumowaniu Doktorant mógłby umieścić schemat obrazujący otrzymane wyniki, podobnie jak w publikacji 1 (Figura 6) znacznie wzbogaciłoby to oprawę graficzną opracowania. W mojej opinii 16 wniosków przedstawiono w sposób chaotyczny, czy Doktorant ma pomysł na uporządkowanie podsumowania otrzymanej ogromnej liczby wyników?

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Pawła Likszo jest oryginalnym dziełem naukowym, zawierającym wyniki, które poszerzają wiedzę z zakresu regulacji mechanizmów molekularnych komórek CL świń, o czym świadczą 2 opublikowane oryginalne artykuły. Autor wykazał się umiejętnością w prowadzeniu badań, wnioskowaniu w oparciu o uzyskane wyniki oraz wiedzą pozwalającą na rzeczową dyskusję z recenzentami prac. Przeprowadzone badania wymagały przygotowania merytorycznego i warsztatowego. Zawarte w niniejszej recenzji uwagi, pytania czy komentarze nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej pracy doktorskiej lecz są zachętą do naukowej dyskusji.

Wniosek końcowy: stwierdzam, że oceniona praca pt. „Analiza zmian proteomu ciała żółtego podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży u świni domowej” odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003, Nr 65, poz.595 z późn.zm.) stawianym kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. W związku z powyższym przekładam Wysokiej Radzie Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pana mgr Pawła Likszo do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem



Kraków, 16 grudnia 2022 roku

dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ