



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

Prof. dr hab. Iwona Bogacka  
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt  
Wydział Biologii i Biotechnologii UWM  
10-719 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 1A

Olsztyn, 18. grudnia 2022 r.



**Ocena rozprawy doktorskiej mgra Pawła Likszo**  
**pt. "Analiza zmian proteomu ciała żółtego podczas cyklu rujowego i wczesnej**  
**cięży u świni domowej"**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie. Praca została wykonana pod opieką naukową Pani dr hab. Beenu Moza Jalali w Zakładzie Immunologii i Patologii Rozrodu, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie. Rozprawę doktorską stanowią dwie opublikowane, spójne tematycznie, prace oryginalne – niżej wyszczególnione – opublikowane w czasopismach z listy *Journal Citation Reports*, których łączny wskaźnik *IF* wynosi 7,49, a liczba punktów na podstawie list ministerialnych wynosi 240 (na str. 9 wskazano punktację MNiSW, ale zakładam, że punktację zaczerpnięto z ostatniej listy MNiE):

1. **Likszo P.**, Skarzynski D.J., Jalali B.M., **2019** Proteomic Analysis of Porcine Pre-ovulatory Follicle Differentiation Into Corpus Luteum. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. Nov 15;10:774. doi: 10.3389/fendo.2019.00774. (*IF*=3,55; 100 pkt.)
2. **Likszo P.**, Skarzynski D.J., Jalali B.M., **2021** Changes in Porcine Corpus Luteum Proteome Associated with Development, Maintenance, Regression, and Rescue during Estrous Cycle and Early Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences*. Oct 29;22(21):11740. doi: 10.3390/ijms222111740. (*IF*=5,94; 140 pkt.)

Publikacje są współautorskie (w każdej po 3 autorów) i we wszystkich Doktorant jest pierwszym autorem. Na podstawie przedłożonych oświadczeń współautorów wynika, że udział Doktoranta polegał na pobieraniu materiału do badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników oraz współudziale w przygotowaniu publikacji do druku. W części „*Author contributions*” publikacji nr 1 nie wskazano Doktoranta wśród osób, które pisały manuskrypt. Brakuje mi także w opisanych aktywnościach Doktoranta współudziału na poziomie koncepcyjnym, a przynajmniej dyskusji przy doborze metodyki, jednak rozumiem, że na ogół ograniczony czas współpracy z doktorantami i niepewność związana z uzyskaniem finansowania projektów skłania promotorów do włączania ich w projekty, które uzyskały finansowanie zdecydowanie wcześniej.

Zbiór publikacji stanowiących rozprawę doktorską poprzedza polskojęzyczne opracowanie (57 stron), w skład którego wchodzi: spis treści, bardzo obszerny wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp zakończony sformułowaniem hipotezy badawczej, celu pracy i zadań badawczych. Kolejne rozdziały obejmują: materiały i metody, wyniki, dyskusja, obszerna bibliografia (ponad 120 pozycji) a także oświadczenia współautorów. Należy podkreślić, że praca wykonana została dzięki realizacji projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (DEC-011/01/B/NZ4/03542 oraz ze środków statutowych Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie.

### **Analiza merytoryczna**

Tematem badawczym podjętym podczas realizacji pracy doktorskiej było określenie zmian w profilu proteomicznym ciała żółtego świni domowej podczas różnych faz jego aktywności, poczynając od momentu tworzenia na bazie komórek pęcherzyka jajnikowego po owulacji (proces luteinizacji), wzrostu, pełnej aktywności oraz regresji (proces luteolizy). Cennym elementem rozprawy była również analiza profilu proteomicznego ciała żółtego we wczesnej ciąży i próby wyjaśnienia mechanizmu odpowiedzialnego za utrzymanie funkcji wydzielniczej badanej struktury.

Ciało żółte jest gruczołem endokrynnym o ogromnym znaczeniu w rozrodzie ssaków. Pomimo, że jest autonomicznym gruczołem, pozostaje pod kontrolą wielu czynników wydzielanych przez przysadkę, jajnik, macicę, łożysko oraz zarodki. Należy podkreślić, że wielokrotnie opisywano czynniki i wskazywano mechanizmy regulujące funkcje ciała żółtego na poziomie molekularnym. Czynniki te o działaniu luteotropowym (wspierające aktywność ciała żółtego) lub luteolitycznym (prowadzące do regresji ciała żółtego) wywierają swój efekt przede wszystkim poprzez regulację ekspresji genów i aktywności białek zaangażowanych w transport cholesterolu i proces steroidogenezy. Wyniki te dostarczyły wielu cennych informacji niezbędnych w formułowaniu i weryfikacji hipotez badawczych zawartych w rozprawie doktorskiej, zachowując jednocześnie nowatorski charakter przeprowadzonych badań. Poznanie nowych regulatorów funkcji ciała żółtego i mechanizmów ich działania jest niezwykle istotne ze względu na coraz częstsze zaburzenia płodności człowieka oraz zwierząt gospodarskich i ma kluczowe znaczenie dla poprawy wydajności reprodukcyjnej.

W badaniach uwzględniono analizę komórek pochodzących z pękniętego pęcherzyka jajnikowego (POF), ciała żółtego w dniach 3, 9, 12 i 15 cyklu rujowego (dc) oraz w 15 dniu ciąży (dp). W zadaniu badawczym nr 1 (publikacja nr 1), materiał doświadczalny (pęcherzyki przedowulacyjne oraz ciała żółte w 3 dniu cyklu rujowego) pobierano podczas uboju w lokalnej rzeźni od loszek o niesynchronizowanych cyklach rujowych. Natomiast w zadaniu badawczym nr 2 i 3 (publikacja nr 2), materiał doświadczalny (ciała żółte w dniach 3, 9, 12 i 15 cyklu rujowego oraz w 15 dniu ciąży) pobierano od loszek poddanych stymulacji hormonalnej przy użyciu gonadotropiny surowicy źrebnej klaczy (eCG) i ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG), a w przypadku loszek ciężarnych – poddanych dodatkowo dwukrotnej inseminacji (w opisie zwierząt w publikacji nr 2 w sekcji *Materials and methods* zabrakło informacji na temat inseminacji). Istotnym wzbogaceniem rozprawy doktorskiej jest uwzględnienie eksperymentu przeprowadzonego w warunkach *in vitro* na skrawkach ciała żółtego pobranych od loszek w 9 i 12 dniu ciąży, w którym zbadano rolę sulfotransferaz estrogenowych w czynności ciała żółtego.

Do analizy proteomu wykorzystano dwukierunkową elektroforezę żelową oraz tandemową spektrometrię mas MALDI TOF-TOF MS/MS. Uzyskane wyniki proteomiczne weryfikowano

za pomocą metody Western blot oraz barwień immunofluorescencyjnych. W celu identyfikacji procesów biologicznych oraz funkcji molekularnych białek o zróżnicowanej ekspresji w ciałku żółtym zastosowano analizę funkcjonalną *in silico* z użyciem Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

Przedstawione w rozprawie doktorskiej wyniki badań, zawarte w dwóch publikacjach w bardzo dobrych czasopismach, dostarczyły wielu nowych i oryginalnych danych na temat biologii ciała żółtego. Należy podkreślić, że publikacje są tematycznie oraz metodycznie spójne. Zastosowane w badaniach analizy laboratoryjne są właściwie dobrane do założonych celów badawczych. Prawdłowo dobrano również analizy statystyczne do opracowania uzyskanych wyników. Porównanie proteomu przedowulacyjnego pęcherzyka jajnikowego (POF) do proteomu wczesnego ciała żółtego (3 dc) dostarczyło ważnych informacji na temat różnic w poziomie 167 białek zaangażowanych w procesy związane m. in. z przeżywalnością komórek oraz wychwytywaniem wolnych rodników. Za interesujący i ważny aspekt prowadzonych badań uważam również wskazanie aktywacji dodatkowych szlaków biochemicznych związanych z metabolizmem steroidów we wczesnym ciałku żółtym (3 dc), tj. szlaku mewalonowego (aktywacja białek HMGC1, FDPS, GGPS1, IDI1), który może wspomagać produkcję progesteronu w początkowym okresie wzrostu. Ponadto, po raz pierwszy wykazano, że białko wiążące witaminę D (VDPD) może być potencjalnym transporterem cząsteczki LDL do ciała żółtego w celu zwiększenia steroidogenezy (publikacja nr 1). W publikacji nr 2, wykazano, że profil proteomiczny ciała żółtego ulega istotnym zmianom w zależności od aktywności (3 dc, 9 dc, 12 dc, 15 dc) w czasie cyklu rujowego. Interesująca jest analiza zmian w profilu proteomicznym CL związanych z jego regresją (12 dc vs. 15 dc). Zidentyfikowano 75 białek o zróżnicowanej ekspresji (poziom 43 białek był większy w 12 dc, natomiast 32 – w 15 dc), które zaangażowane są w regulację odpowiedzi na stres oksydacyjny, proces apoptozy, infiltrację neutrofili, reorganizację cytoszkieletu i syntezę steroidów. Analizując zmiany proteomiczne związane z utrzymaniem funkcji ciała żółtego w czasie ciąży dokonano porównania profili proteomicznych CL w 15 dniu cyklu i 15 dniu ciąży. Wykazano zwiększenie poziomu 67 białek w 15 dp oraz 24 białek (w opracowaniu polskojęzycznym wskazano 43) w 15 dc. Zidentyfikowane białka są zaangażowane głównie w regulację procesu steroidogenezy, metabolizmu lipidów, apoptozy oraz tworzenia reaktywnych form tlenu (publikacja nr 2).

### Uwagi i pytania

Prace naukowe, które są podstawą ocenianej dysertacji, opublikowano w czasopismach o międzynarodowym zasięgu i wysokich wskaźnikach bibliometrycznych. Przeszły one również wieloetapowy proces recenzencki i edytorski. Podczas analizy publikacji, ale przede wszystkim podczas oceny polskojęzycznego opracowania nasunęło mi się kilka uwag, które chciałabym przekazać:

- 1) Cel pracy przedstawiony w streszczeniu rozprawy (str. 10) nie jest tożsamy z celem pracy umieszczonym w końcowej części wstępu (str. 22). Podobna uwaga dotyczy prezentacji szczegółowych zadań badawczych; mianowicie w streszczeniu zawarto podpunkt o „możliwym mechanizmie luteolizy indukowanej przez endogenną  $PGF2\alpha$ ”, natomiast zabrakło tego zadania na str. 22. Ponadto, Doktorant wskazuje w sekcji *Wyniki*, że w ramach zadania badawczego wykonał eksperyment *in vitro*, jednak nie wskazuje takiego zadania na str. 22, gdzie znajduje się opis celu pracy i zadań badawczych. Proszę zwrócić uwagę na mało precyzyjne i niejednolite określenie kluczowych etapów rozwoju ciała żółtego w czasie cyklu rujowego: w streszczeniu (str. 10) – wczesno-lutealna, wczesno-środkowo-lutealna, dojrzałość czynnościowa podczas fazy środkowo-lutealnej i regresja, natomiast w tekście na str. 22 są następujące określenia – wzrost, funkcjonowanie i luteoliza CL

(określenie „funkcjonowanie” uważam za niewłaściwe, bo dotyczy ono również wcześniejszych etapów powstawania ciała żółtego, które także produkuje steroidy, ale w mniejszych ilościach). Jeszcze inne etapy funkcjonowania ciała żółtego zawarto w hipotezie badawczej – rozwój, czynność lutealna i regresja, jest jeszcze termin „przełom wrażliwości luteolitycznej” (str. 48). Taki brak konsekwencji w stosowanej przez Doktoranta terminologii zdecydowanie utrudnia analizę opracowania polskojęzycznego. Bardzo proszę o ujednolicenie terminologii podczas prezentacji. Może najprościej byłoby posługiwać się konkretnymi dniami cyklu rujowego lub ciąży, a raz i dokładnie wyjaśnić co było podstawą ich wyboru np. w części *Materiały i metody*.

- 2) W *Podsumowaniu* (część 5 opracowania polskojęzycznego, str. 47-49), Doktorant formułuje 16 rozbudowanych wniosków, które w przeważającej części nimi nie są. Sugerowałabym ponowną analizę tego rozdziału i wyodrębnienie punktów, które istotnie są podsumowaniem uzyskanych wyników i przedstawienie je w sposób bardziej przejrzysty, opierając się na realizowanych zadaniach badawczych i uporządkowanych etapach rozwoju/aktywności ciała żółtego w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży (niektóre z nich można połączyć). Sugerowałabym także wyodrębnienie i dopracowanie wniosków.
- 3) Na str. 26 opracowania polskojęzycznego oraz na str. 17 publikacji nr 2, Doktorant wskazuje, że w ramach walidacji otrzymanych wyników proteomicznych wykonano Western blot w systemie 1-DE i 2-DE (innym razem jest 1D i 2D, jeszcze w innym miejscu 2D-PAGE). Proszę o odpowiedź, w jaki sposób stwierdzono różnice statystyczne (opisane na str. 9 w publikacji nr 2) dla białek APOA1 oraz HSP27 w badanych grupach stosując system 2D/2-DE (rycina 6A w publikacji nr 2, brak białka referencyjnego) i dlaczego nie zastosowano systemu 1D/1-DE, tak jak w przypadku białek CP i GC (ryc. 6B-D, publikacja nr 2) lub wielu innych białek (ryc. 5, publikacja nr 1). Wątpliwy jest wybór białka referencyjnego ACTB służącego do walidacji wyników za pomocą metody Western blot (str. 25), jeśli wyniki wskazują na przykład zwiększenie ekspresji białek cytoszkieletu (w tym ACTB) w proteomie POF w porównaniu do wczesnego CL (str. 38, l. 23) lub zwiększenie ekspresji białek regulujących ruchliwość komórek (w tym ACTB) w proteomie CL w dniu 3. w porównaniu do dnia 9. cyklu rujowego (str. 32, l. 22).
- 4) Analiza immunofluorescencyjna, zastosowana w celu weryfikacji ekspresji białka APOA1, umożliwiła przede wszystkim ocenę lokalizacji białka APOA1 (str. 9 i 17 publikacja nr 2, oraz str. 36 opracowania), zatem na jakiej podstawie Autor stwierdził „zwiększoną ekspresję tego białka w 9 i 12 dc oraz 15 dp w porównaniu do 3 i 15 dc” nie stosując/prezentując analiz statystycznych?
- 5) Proszę o uściślenie okresu macicznego rozpoznania ciąży u świni, ponieważ występują różnice w opracowaniu polskojęzycznym (str. 17 – dni 12-14, natomiast str. 34 – dni 10-13) oraz w publikacji nr 2 (str. 6 – dni 11-13).
- 6) W opracowaniu polskojęzycznym występuje szereg niefortunnnych określeń (stosowanych raczej w mowie potocznej) takich jak: „wzrost lutealny” (str 48, l. 2); „lutealne ciało żółte” (str. 49, l. 6); „funkcja lutealna” (str. 22, l. 4); „zmiany w proteomie lutealnym” (str. 38, l. 17); „wimentyno-ujemne myszy” (str. 43, l. 26); „rola prożyciowa” (str. 45, l. 23); „plamy białkowe/plamki białka” (str. 31, l. 3/str. 28); „luteinizacja pęcherzyka jajnikowego w CL” (str. 16, l. 16, str. 21, l. 4) – nie jest procesem fizjologicznym, natomiast występuje w zespole luteinizacji niepękniętego pęcherzyka (LUF) i skutkuje zaburzeniami w przebiegu cyklu i problemami z zajściem w ciążę; podobne sformułowanie „formowanie CL z pęcherzyka jajnikowego” (str. 20). W zdaniu na str. 45, l. 27, wkradł się błąd, bowiem aktywacja kaspaz 8

i 3 nie chroni komórek przed apoptozą a wręcz przeciwnie – prowadzi do apoptozy. Zwracam też uwagę na błędy językowe, interpunkcyjne i tzw. literówki: nazwisko znanego endokrynologa brzmi Bazer a nie Bazar (str. 19); zamiast „nm” (str. 37, l. 12) powinno być „nM”, brak konsekwencji w pisowni identyfikowanych białek (np. str. 7, 48, 49 – SLUT lub SULT/SULT1A1 lub SULTA1). W opracowaniu polskojęzycznym używano określenia „przysadka mózgowa” (np. str. 18). Wcześniej termin ten był powszechnie używany, jednak od wielu lat zaleca się stosowanie formy skróconej nazwy tego gruczołu, tj. przysadka.

*Dodatkowe pytania:*

- 7) Czy porównywano profile proteomiczne ciałek żółtych w 3 dniu cyklu rujowego z zadania pierwszego (od loszek z niezsynchronizowanymi cyklami rujowymi, publikacja nr 1) oraz zadania 2 (od loszek poddanych stymulacji hormonalnej, publikacja nr 2)?
- 8) Czy na podstawie uzyskanych wyników można sformułować wniosek dotyczący możliwego mechanizmu luteolizy indukowanej przez endogenną PGF2a? (zadanie badawcze nr 4 zawarte w streszczeniu)?
- 9) Czy na podstawie uzyskanych wyników można wskazać (zaproponować) markery procesu luteinizacji?
- 10) Jaki problem badawczy, który wyłonił się z Pana badań, uważa Pan za najbardziej interesujący i zasługujący na wyjaśnienie w pierwszej kolejności, i dlaczego?

## **PODSUMOWANIE**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera nowe i wartościowe dane, które zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach z dziedziny naukowej i stanowią cenne uzupełnienie wiedzy z zakresu biologii rozrodu. Realizacja zaplanowanych zadań wymagała dużego nakładu pracy, Doktorant wykazał się dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, znajomością nowoczesnych metod eksperymentalnych oraz piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Doktorant zdobył niezbędne doświadczenie i umiejętności konieczne w pracy badawczej. Mam nadzieję, że niektóre przedstawione uwagi i sugestie będą przydatne podczas przygotowywania kolejnych prac do druku, a jeszcze inne wykorzystane w przyszłej pracy naukowej Doktoranta.

## **WNIOSEK KOŃCOWY**

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zatytułowana „*Analiza zmian proteomu ciała żółtego podczas cyklu rujowego i wczesnej ciąży u świni domowej*” spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003, 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 mgra Pawła Likszo oraz dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

*Tadeusz Bazer*