



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

Dr hab. inż. Zofia E. Madeja

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

i Nauk o Zwierzętach, UP Poznań

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Tel. +48 (61) 846 6111

Email - zofia.madeja@up.poznan.pl



27.08.2024, Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Walentyny Jończyk,

pt. „Wpływ egzogennej $PGF_{2\alpha}$ na szlaki regulacyjne angiogenezy, steroidogenezy i śmierci komórek ciała żółtego krowy w zależności od sposobu jej podania: lokalnie i obwodowo”

wykonanej w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności,
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

pod kierunkiem Prof. dr hab. n wet. Dariusza Skarżyńskiego

oraz pod opieką promotora pomocniczego: dr n. wet. Katarzyny Karoliny Piotrowskiej-Tomala

1. Zasadność i znaczenie podjętych badań:

Tematyka badawcza podjęta w przedłożonej rozprawie doktorskiej obejmuje zagadnienia, które są ciekawe poznawczo, nie tylko z punktu widzenia medycyny weterynaryjnej i rozrodu zwierząt, ale również mogą dostarczyć cennych danych do wykorzystania w medycynie człowieka. Wyniki badań porównawczych pokazują, że pewne aspekty związane z fizjologią rozrodu zwierząt gospodarskich (w tym bydła) stanowią mogą doskonały model do badań nad rozrodem (w tym zaburzeń płodności) człowieka. Bydło wskazywane jest również jako organizm modelowy do badań z zakresu rozrodu człowieka, ponieważ jedynie dla tych dwóch gatunków powszechnie stosowane są techniki wspomaganego rozrodu (ART). W przypadku bydła i człowieka wykazano liczne podobieństwa związane z funkcją jajników - dotyczące m.in. przebiegu folikulogenezy i procesów związanych z nabieraniem kompetencji rozwojowej przez oocyty (zarówno w modelach *in vivo* jak *in vitro*). Ponadto badania pokazują, że działanie regulatorowych mechanizmów komórkowych oraz endokrynnych związanych z funkcją ciała żółtego (CL) wykazuje szereg podobieństw pomiędzy przeżuwaczami a naczelnymi. Dlatego też problematyka badawcza podjęta w prezentowanej pracy doktorskiej wpisuje się w nurt obecnie prowadzonych prac naukowych, oraz posiada niewątpliwie watek aplikacyjny. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do prac z zakresu poprawy wydajności ART oraz poprawy efektywności powszechnie stosowanych zabiegów



weterynaryjnych związanych np. z regulacją cyklu rujowego u bydła, czy regulacją hormonalną funkcji jajnika u kobiet.

2. Ocena formalna.

Przedstawiona do recenzji praca jest opracowaniem będącym kompilacją trzech oryginalnych prac naukowych, zawierającym wszystkie wymagane elementy niezbędne do przedstawienia oraz sformułowania rozprawy doktorskiej. Badania naukowe stanowiące podstawę pracy doktorskiej zostały opublikowane w specjalistycznych czasopismach o znaczącej renomie oraz międzynarodowym zasięgu: J. Dairy Sci (5letni IF= 4,1), BMC Vet Res (5letni IF= 2,6), Frontiers in Vet Sci (5letni IF= 2,6). We wszystkich przedstawionych pracach doktorantka jest pierwszym autorem o znaczącym wkładzie merytorycznym (przekraczającym 50%), który obejmował zarówno zadania badawcze – eksperymenty (doświadczenia *in vivo* oraz *in vitro*), jak i analizę danych interpretację oraz opracowanie wyników.

Wstęp do prezentacji uzyskanych wyników został opracowany z należytą starannością, hipoteza badawcza, cele pracy zostały prawidłowo sformułowane. Cennym dodatkiem do opracowania są schematy pokazujące układy poszczególnych doświadczeń. Materiały i metody opracowano klarownie, sposób wykonania analiz (podejście metodyczne) jest prawidłowy i zasadny. Na szczególnie moje uznanie zasługuje przygotowanie oraz wykonanie analizy ekspresji genów na poziomie mRNA, które uwzględnia wszystkie „złote zasady” tej techniki, szczególnie określenie stabilności genów referencyjnych. Zadania badawcze korelują z uzyskanymi wynikami. Dyskusja stanowi zbiorcze podsumowanie danych prezentowanych w oryginalnych pracach. Praca stanowi spójną całość.

3. Uwagi szczegółowe:

Prace eksperymentalne w przedstawionym opracowaniu (w publikacjach) obejmują doświadczenia zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. W każdym z tych doświadczeń, na ich finalnym etapie wykonywana jest owarektomia. Z tak uzyskanego materiału pobierany był materiał do analizy ekspresji genów (doświadczenie 1 i 3) w CL, oznaczano również poziom hormonów we krwi. Prezentowane publikacje stanowią pewną „zamkniętą całość” zarówno koncepcyjną jak i badawczą, gdzie zgodnie z założeniami skupiono się jedynie na wpływie prostaglandyn na funkcję, czy degradację (luteolizę) ciała żółtego. Analizy następstw stosowania PGF_{2α} dotyczą głównie zmian w poziomach ekspresji genów (mRNA i białko) genów związanych szeroko pojętą funkcją CL w materiale pobranym z CL. Takie założenie wynika z tematu pracy oraz przedstawionych celów badawczych.

- Jednak oceniając całościowo prezentowaną rozprawę oraz szerszy kontekst fizjologiczny – jak podaje autorka „*luteoliza jest określana jako zasadniczy mechanizm warunkujący prawidłowy i sprawny przebieg cyklu jajnikowego u ssaków*” część eksperymentalna wprost



prosi się o wykonanie analiz jajników (pęcherzyki jajnikowe, oocyty). Receptory dla prostaglandyn znajdują się m.in. w komórkach pęcherzykowych. Prostaglandyna E2 (PGE) jest miejscowo produkowana przez komórki pęcherzykowe. Istnieją, (wymagające dalszych badań) sugestie iż synteza prostaglandyn u bydła może być również indukowana poprzez odpowiedź na wyrzut LH, co w efekcie może przekładać się na udział w regulacji procesów sterujących owulacją (Theriogenology, 2021, 171:30-37). Wykazano, że obecność PGE w mikrośrodkowisku oocyta stymuluje ekspansję komórek pęcherzykowych w obrębie kompleksu oocyt-kumulus (COC) oraz reguluje apoptozę, oraz że oocyt posiada receptory specyficzne dla PGE2. Oczywiście PGE jest czynnikiem luteotropowym, jednak w literaturze pojawiły się doniesienia, że dodatek PGF_{2α} do pożywki do dojrzewania *in vitro* oocytów bydła może działać stymulująco na wznowienie mejozy (podobnie jak PGE2) (Reprod 2008, 136:733-40). Wzrost stężenia PGE2 i PGF_{2α} w pęcherzyku jajnikowym tuż przed owulacją odnotowano dla kilku gatunków zwierząt (bydło, koń, naczelnie). Wyniki prac dotyczących wpływu prostaglandyn PGE2 i PGF_{2α} na procesy związane dojrzewaniem oocytów bydła nie są jednoznaczne. W Dyskusji autorka podaje, że „*Luteoliza strukturalna oraz funkcjonalna są podstawowymi mechanizmami przerwania fazy lutealnej, co umożliwia dojrzewanie i pęknięcie kolejnego pęcherzyka jajnikowego...*”. Z tego względu uważam, że dla opisanego pełnego obrazu fizjologicznego, oraz w kontekście aplikacyjnym, dodanie wątku związanego z dojrzewaniem pęcherzyków jajnikowych, czy analizą nabierania kompetencji rozwojowej przez oocyty jest istotna. Nawet jeśli ten wątek nie został poruszony w części badawczej projektu, powinien się pojawić w Dyskusji. Z tego względu proszę o uwzględnienie tych elementów w odpowiedzi na recenzję - do jakich zmian może dochodzić w jajniku po iniekcji PGF_{2α}, czy może dochodzić do czasowego upośledzenia procesów związanych z wystąpieniem kolejnego cyklu rujowego, z owulacją i czy zabiegi te mogą wpływać na jakość owulowanych oocytów?

- Na jakiej podstawie autorka dokonywała wyboru genów do analiz szlaków regulacyjnych? Zadaję to pytanie ponieważ, pod pojęciem „szlaku regulacyjnego” czy „ścieżki sygnałowej” kryje się cała kaskada zdarzeń, która aktywuje (lub wyłącza) czynniki które współdziałają ze sobą na wielu poziomach – transkrypcji, translacji, zmian konformacji białek i/lub ich lokalizacji. Badane przez autorkę czynniki są ważnymi elementami tych ścieżek, ale angiogeneza to złożony proces oparty na interakcji wielu czynników. Przykładowo VEGF-A jest głównym mediatorem angiogenezy, ale w wyniku alternatywnego splicingu powstają 4 izoformy, które wykazują różne powinowactwo do HSPG (heparyn sulphate proteoglycans). Równowaga pomiędzy HSPG a związanym z nim VEGF-A tworzy gradient, który umożliwia komórkom endotelium odpowiedź na sygnały proangiogenne. Tworzenie nowych naczyń krwionośnych podlega regulacji szeregu ścieżek sygnalizacyjnych jak Notch, Ephrin-B2/EphB4 czy Sonic Hedgehog. Z kolei VEGF współdziała z angiopoetyną 1 i 2. Ang-1 działając za pośrednictwem receptora Tie-2 przebudowuje naczynia krwionośne i stabilizuje je, a Ang-2 podlega ekspresji w miejscach przebudowy naczyń krwionośnych. W Dyskusji na



str. 25 szeroko omówione zostały uzyskane wyniki (zmiany w poziomie ekspresji badanych genów), natomiast w moim odczuciu brak tam szerszego kontekstu działania i interakcji ścieżki/ścieżek sygnalizacyjnych. Omawiany jest wzrost lub spadek poziomu ekspresji danych genów, ale one stanowią tylko pewien element całego szlaku oddziaływań.

- Ponieważ w założeniach do pracy i wnioskach autorka wskazuje na duży potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników, warto ten wątek uwypuklić w dyskusji i wskazać możliwości zastosowania w procedurach ART. Jak doktorantka widzi potencjalny dalszy rozwój poruszanej przez nią tematyki badawczej w kontekście aplikacyjnym, szczególnie, że mechanizmy molekularne i ścieżki oddziaływań hormonalnych są podobne u bydła i człowieka.

4. Podsumowanie i ocena pracy.

Prezentowaną rozprawę doktorską Pani mgr. Agnieszki W. Jończyk oceniam bardzo wysoko. Prezentowany cykl prac stanowi pełną tematycznie całość. Moje uwagi wynikają z chęci uwypuklenia znaczenia uzyskanych wyników dla szerszego grona osób zajmującego się rozrodem ssaków oraz wskazania ewentualnych możliwości prowadzenia dalszych prac badawczych. Podjęta tematyka badawcza stanowi oryginalne rozwiązanie stawianego problemu naukowego, a uzyskane wyniki posiadają znaczny potencjał aplikacyjny

Łączny dorobek (PubMed) stanowi 11 prac naukowych których doktorantka jest współautorką, wszystkie prace znajdują się w obrębie tematyki badawczej prezentowanej w rozprawie doktorskiej, co świadczy o ogromnym zaangażowaniu doktorantki w prace badawcze realizowane w zespole. W przedstawionym do recenzji cyklu prac, w każdym przypadku autorka wykazuje wiodący udział (powyżej 50%) oraz wkład we wszystkie elementy związane z procesem publikacyjnym – od wykonania badań, po opracowanie wyników i pisanie pracy. Wszystko to świadczy o dojrzałości naukowej doktorantki i zasługuje na uznanie.

W związku z powyższym, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki W. Jończyk spełnia warunki stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U Nr 65, poz. 595 z późn.zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki W. Jończyk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplina zootechnika i rybactwo.

Zofia E. Madeja

27. 08. 2024