



**INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, tel.: (+48 89) 523-46-86; 524-03-13  
Fax (+48 89) 524-01-24; e-mail [instytut@pan.olsztyn.pl](mailto:instytut@pan.olsztyn.pl); [www.pan.olsztyn.pl](http://www.pan.olsztyn.pl)

Olsztyn, 26.09.2021 r

*Dr hab. Aneta Andronowska, prof. instytutu  
Zakład Mechanizmów Działania Hormonów  
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności  
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie*

**OCENA PRACY DOKTORSKIEJ**

**Mgr Elżbiety Czaja**

**pt. „Wpływ związków o aktywności endokrynej na rozwój i funkcjonowanie macicy świni”**

wykonanej w Zakładzie Endokrynologii  
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych  
Uniwersytet Jagielloński  
pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Słomczyńskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Elżbiety Czaja „Wpływ związków o aktywności endokrynej na rozwój i funkcjonowanie macicy świni” została wykonana w Zakładzie Endokrynologii, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Słomczyńskiej.

Praca doktorska mgr Elżbiety Czaja liczy 147 stron wydruku komputerowego. Rozprawa została ujęta w sposób typowy dla prac na stopień naukowy. Autorka wyodrębniła w niej następujące rozdziały: wstęp (21 stron) poprzedzony spisem treści i wykazem stosowanych skrótów, uzasadnienie i cele pracy (2 strony), materiał i metody (19 stron), wyniki (26 stron), podsumowanie wyników (3 strony), dyskusja (32 strony), wnioski oraz sposób prezentacji uzyskanych wyników (2 strony) a także streszczenie w języku polskim i angielskim (4 strony). Pracę kończy 27 stron spisu 287 pozycji piśmiennictwa.

Wstęp został podzielony na 8 podrozdziałów, w których Doktorantka opisuje budowę i postnatalny rozwój macicy świni, tworzenie gruczołów macicznych a także charakterystykę dojrzałych komórek macierzystych endometrium. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisuje związki o aktywności endokrynej takie jak: flutamid, propionat testosteronu, 4-tert-

oktylofenol, ICI 182,780 oraz metoksychlor, na których działanie mogą być narażone zwierzęta, a także mechanizmy sygnalizacji estrogenowej, androgennej a także szlak transdukcji sygnału: PI3K/AKT oraz Ras/Raf/MEK/ERK.

Doktorantka postawiła sobie za cel określenie *in vivo* wpływu neonatalnej ekspozycji świń na propionat testosteronu, flutamid, 4-tert-oktylofenol, ICI 182, 780 i metoksychlor na 1/zmiany morfologiczne, 2/lokalizację ER, GPER, AR, ZIP9, 3/zmiany w ekspresji białek biorących udział w procesach proliferacji i apoptozy, 4/ zmiany poziomu fosforylacji kinaz białkowych uczestniczących w nieklasycznej drodze działania hormonów steroidowych (c-Src, raf-1, ERK1/2, Akt) oraz 5/określenie lokalizacji i ekspresji markerów komórek macierzystych/pluripotencjalnych, w tkankach macic świń.

Materiałem badawczym były macice pobrane w 11 dniu życia oraz po drugim cyklu estralnym od loszek z grup doświadczalnych (n=4), które przez 10 kolejnych dni po urodzeniu otrzymywały podskórną związkę o aktywności endokrynej oraz od loszek grup kontrolnych otrzymujących olej kukurydziany. Z przedstawionego w rozdziale **Materiał i Metody** opisu, wynika iż od loszek niedojrzałych płciowo materiałem do badań były przekroje rogu macicy, natomiast od zwierząt dojrzałych płciowo pobrano tylko fragmenty endometrium. Natomiast w opisach w Rozdziałach : 3.2 Wstępne przygotowanie materiału do badań, 3.6.1 Izolacja białka i przygotowanie próbek do analizy Western blot oraz 3.7.1. Izolacja RNA, nie jest jasne jakie tkanki macicy były pobierane do badań: endometrium, miometrium czy też fragmenty przekrojów rogów macic. Jeżeli materiałem badawczym były przekroje rogów macic w grupie loszek niedojrzałych płciowo, a fragmenty endometrium w przypadku loszek dojrzałych płciowo, to **dlaczego nie zastosowano tego samego modelu oraz czy można porównywać wyniki badań wykonanych na przekrojach macic z analizami wykonanymi tylko na endometrium, zwłaszcza te dotyczące ekspresji badanych czynników oraz zmian morfologicznych.**

Do realizacji celu badań Doktorantka zastosowała techniki umożliwiające analizę ekspresji i lokalizację badanych czynników na różnych poziomach tj. Real Time PCR, Western Blot, metody immunohistochemiczne, metodę TUNEL, a także klasyczne barwienie HE pozwalające na histologiczną ocenę badanych tkanek. Uzyskane dane zostały opracowane z zastosowaniem odpowiednich testów statystycznych.

Przedstawienie schematyczne przebiegu doświadczenia a także niektórych procedur nie tylko dobrze obrazuje przeprowadzone doświadczenia a także wskazuje, iż doktorantka dokładnie zapoznała się z każdą stosowaną metodą.

W ocenie recenzenta wybrane metody badawcze i testy statystyczne stanowiły solidną podstawę do osiągnięcia zaplanowanego celu pracy.

**Wyniki** badań przedstawione zostały w sposób uporządkowany. W tekst rozdziału wkomponowane są liczne wykresy oraz zdjęcia mikroskopowe badanych tkanek, dokumentujące wyniki badań (Tablica 1-28). Szkoda tylko, że dobrej jakości zdjęcia zamieszczone w manuskrypcie są bardzo małe i przez to czasami nieczytelne. Ciekawym i wartym podkreślenia jest sposób podsumowania wyników, gdzie w **tabeli 8** zestawiono wyniki analiz Western blot, natomiast w **tabeli 9** przedstawiono zestawienie wyników analiz qRT-PCR.

W rozdziale **Dyskusja** Doktorantka dokonała analizy uzyskanych wyników badań, odnosząc je do badań innych Autorów. W pierwszej części rozdziału Doktorantka analizowała wpływ związków o aktywności endokrynej (EAC) na morfologię macicy świni. Kolejno odniosła się do wpływu EAC na procesy proliferacji i apoptozy oraz na ekspresję i lokalizację receptorów estrogenowych i androgenowych a także na ekspresję i fosforylację białek szlaku MAPK/ERK i PI3K/Akt.

Pracę doktorską kończy 5 **Wniosków**, które są odpowiedzią na wyznaczone zadania badawcze, wykaz doniesień konferencyjnych na których prezentowane były wyniki badań, **Streszczenie** w języku polskim i angielskim oraz **Literatura**. Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Elżbiety Czaja stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe. Bardzo wysoko oceniam pracę zarówno pod względem metodycznym jak i merytorycznym, jednak mam kilka pytań i uwag:

1. **Materiał i Metody:** na Rys. 16 przedstawiającym schemat doświadczenia zabrakło loszek grup kontrolnych. W opisie analiz immunohistochemicznych oraz metodzie tunel brak jest informacji ile skrawków z każdej pobranej tkanki barwiono a następnie analizowano? Ile pól/komórek z każdego skrawka było analizowanych?
2. W rozdziale **Wyniki** na stronie 54, Tablica 2 – w opisie brak informacji jakiej grupy doświadczałnej dotyczą prezentowane dane. Z opisu wyników wynika iż prezentowane dane dotyczą świń 11-dniowych. Czy podobne analizy przeprowadzono również w grupie loszek dojrzałych płciowo ? Czy obserwowano różnice w morfologii komórek nabłonka powierzchniowego błony śluzowej macicy świni pod wpływem neonatalnej ekspozycji na badane związki?
3. W rozdziale **Wyniki 4.2 Identyfikacja komórek apoptotycznych** stwierdzając iż: „*małą liczbę komórek apoptotycznych obserwowano jedynie w nabłonku światła macicy*” chodziło chyba Doktorantce o komórki nabłonka powierzchniowego błony

śluzowej/endometrium (uwaga dotyczy całej pracy). W **Tablicy 4** mylące są wstawki, chyba z powiększeniem komórek apoptotycznych. Nie jest to wyjaśnione ani w opisie Tablicy, ani w tekście. Niefortunnie również użyto określenia: komórki negatywne – chyba chodzi raczej o kontrolę negatywną. W opisie Tablicy 5 brak jest informacji odnośnie wstawki: czy jest to kontrola czy powiększenie. Brak również zdjęć kontroli negatywnej.

4. **Wyniki rozdział 4.3.1. Ocena immunoekspresji i lokalizacji antygenu jądrowego komórek proliferujących PCNA.** W tekście użyto określenia „komórki endometrium”, proszę o wyjaśnienie o jakie komórki chodzi. Niefortunne też jest stosowanie określenia loszek/świń dorosłych – powinno być dojrzałe płciowo.
5. **Wyniki rozdział 4.3.4. Lokalizacja białek szlaków Ras/raf/MEK/ERK i PI3K/Akt.** Ponieważ Doktorantka dość często używa zamiennie określeń świni neonatalne, świni 11-dniowe/loszki niedojrzałe płciowo, nie jest jasne o jaką grupę loszek chodzi w opisie „*W grupie loszek pozytywna reakcję immunohistochemiczną potwierdzającą obecność kinazy PI3K...*”
6. **Rozdział 4.4. Analiza Western blot:** proszę wyjaśnić czy do analiz pobierano przekroje macic czy tylko endometrium?
7. Sugerowałabym aby przy przygotowywaniu pracy do druku w opisach wszystkich **Tablec**, oraz w tekście stosować określenie: loszki dojrzałe płciowo a nie dorosłe, w odniesieniu do loszek.

Przedstawione uwagi mają raczej charakter redakcyjny i dyskusyjny, nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej ocenianej pracy.

#### **Wniosek końcowy**

Rozprawę doktorską Pani mgr Elżbiety Czaja oceniam pozytywnie. Podjęty przez Doktorantkę temat jest bardzo istotny i ponadczasowy. Macica jest elementem układu rozrodczego, której jak do tej pory, nie da się niczym zastąpić. Dlatego też badania nad prawidłowym jej rozwojem są bardzo istotne. Przedstawiona do recenzji praca ma znaczenie poznawcze i wskazuje złożoność procesów regulujących prawidłowy rozwój macicy. Uzyskane wyniki nie tylko dostarczają nowej wiedzy na temat wpływu czynników o aktywności endokrynnej w okresie neonatalnym ale też wskazują na ich długofalowe oddziaływanie na macicę świni domowej.

Z przekonaniem stwierdzam, iż przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w artykule 13 Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach

naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U. z 2003r, nr 65, poz.595, z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Czaja i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

*Andronawska Aneta*